

Effekter av *in vivo* eksponering
for vannløselig fraksjon av to
råoljer og diesel på juvenil
torsk (*Gadus morhua*).

av David Pettersen Eidsvoll



MSc i toksikologi

August 2011

UNIVERSITETET I OSLO

Biologisk Institutt

Forord

Denne masteroppgaven er utført ved biologisk institutt ved Universitetet i Oslo og ved Norsk Institutt for Vannforskning (NIVA) i perioden august 2009 til juni 2011. Arbeidet har vært veiledet av professor Ketil Hylland (Universitetet i Oslo og NIVA) med internveileder postdoc Tor Fredrik Holth (Universitetet i Oslo). En stor takk går til Ketil Hylland for muligheten til å delta i et internasjonalt samarbeidsprosjekt, for inspirasjon og for alltid å være tilgjengelig. Og en stor takk til Tor Fredrik Holth for tålmodigheten din og for at du har stilt opp ekstra.

Takk til alle medarbeiderne i TOXPROF fra NIVA, CSIC, IFREMER, Cefas, IEO og CSIC for introduksjon til forskning på høyt internasjonalt nivå. En stor takk til Concepción Martínez-Gómez for ditt utrolig gode humør, din åpenhet og gjestfrihet.

Tusen takk til alle dere som har bidratt i innsamling av prøver, til å gjøre lange arbeidsdager mer gledesfulle og livlige, til alle på laboratoriet, til alle på Biologisk stasjon i Drøbak, Sondre og Hans Erik, til alle dere på lesesalen og i gangene på UiO, Inger Lise, Bjørn, Nicolai, Kjetil, Lisa Marie, Solomon, Jørgen, Mazy og mange flere.

Ikke minst, en stor takk til familien og kjæresten min. Oppgaven ville ikke blitt den samme uten dere.

Oslo, august 2011

David Pettersen Eidsvoll

Sammendrag

Målet med oppgaven var å gi en toksikologisk karakteristikk av de oljer som transportertes langs kysten av EU. Som en del av prosjektet ble juvenil oppdrettstorsk (*Gadus morhua*) eksponert *in vivo* for vannløselig fraksjon (WAF) av skipsdiesel og råoljene Arabian light og Ekofisk. Diesel og olje ble forvitret og WAF ble kontinuerlig laget gjennom hele forsøksperioden ved å pumpe vann gjennom kolonner som inneholdt oljeholdig grus. Fisken ble eksponert for to konsentrasjoner av diesel og av de to råoljene i tre uker med to prøvetakinger i løpet av perioden. Det ble målt aktivitet av cytokrom P450 1A (EROD) i gjeller og konsentrasjon av cytokrom P450 1A i lever. Gentoksisitet ble evaluert ved å måle frekvens av fragmenterte cellekjerner i røde blodceller (mikronukleus). Samarbeidspartene (NIVA, Cefas, IFREMER, IEO, CSIC) i prosjektet målte i tillegg konsentrasjoner av polisykliske aromatiske hydrokarboner (PAH) i vann, PAH metabolitter i galle fra torsken, kvantitet av cytokrom P450 1A mRNA i leveren til torsken og aktivitet av cytokrom P450 1A i leveren (EROD) til torsken.

Resultatene fra *in vivo* eksponeringen viste eksponering med økologisk relevante konsentrasjoner av PAHer i vannet etter en uke og nedgang etter tre uker. Det var vist opptak av PAHer i torsken med høyere konsentrasjoner av metabolitter i gallen etter 1 uke og nedgang etter tre uker i forhold til kontrollfisken. Det var signifikant oppregulerte nivåer av cytokrom P4501A mRNA i leveren til torsken fra alle behandlinger etter en uke og alle behandlinger, utenom diesel lav, etter tre uker. Det var ingen signifikant induksjon av cytokrom P4501A proteiner i torsken etter en uke, men signifikant induksjon etter tre uker i Arabian light- og diesel høydosene. Det var signifikant induksjon av EROD aktivitet i lever fra torsken i Arabian light lav- og høydosene etter en uke, og signifikante induksjon i leveren til torsken fra Arabian light høy-, Ekofisk lav- og Ekofisk høydosene etter tre uker. Det var en tendens, men ingen signifikante induksjon, i EROD aktivitet i gjelle til torsken etter en uke. Etter tre uker var det signifikant induksjon av EOD aktivitet i gjellene til fisk fra Arabian light høy-, Ekofisk lav- og Ekofisk høydosene. Alle signifikante endringer i den oljeeksponerte torsken var i forhold til kontrollfisken. Det var økt frekvens av mikronukleusdannelse i røde blodlegemer relatert til eksponering og indikerte genotoksiske responser for eksponeringen etter tre uker. Torsk fra dieselbehandlingene hadde høyere frekvens av MN enn oljebehandlingene. Resultatene viser at det er mulig å påvise eksponering for den vannløslige delen av olje og diesel ved hjelp av utvalgte biomarkører og at eksponering fra forskjellige typer olje og diesel kan gi ulike responser.

Konklusjonene fra denne oppgaven vil være nyttige ved valg og bruk av biomarkører til vurdering av konsekvenser ved oljeutslipp.

Innholdsfortegnelse

1	INNLEDNING	6
2	MATERIALER OG METODE	11
2.1	OLJE OG FORBEHANDLINGER	11
2.2	FORSØKSORGANISME	11
2.3	EKSPONERING.....	12
2.4	PRØVETAKING.....	13
2.5	VANNPRØVER	14
2.6	OPPARBEIDING AV LEVER	14
2.7	PROTEINER I LEVER	15
2.8	CYP1A AKTIVITET I GJELLE MED ETOKSYRESORUFIN-O-DEETYLASE (EROD).....	15
2.9	GALLEMETABOLITTER.....	15
2.10	CYP1A MRNA FRA LEVER.....	16
2.11	CYP1A KVANTITET (ELISA) I LEVER	16
2.12	CYP1A AKTIVITET I LEVER (EROD).....	17
2.13	MIKRONUKLEUS I RØDE BLODCELLER.....	17
2.14	STATISTISKE METODER.....	18
3	RESULTATER	19
3.1	KONSENTRASJON I VANN.....	19
3.2	GALLE-METABOLITTER AV POLYSYKLISKE AROMATISKE HYDROKARBONER.....	22
3.3	CYP1A MRNA I LEVER	23
3.4	CYP1A PROTEIN I LEVER (ELISA)	25
3.5	CYP1A AKTIVITET I LEVER (EROD).....	26
3.6	CYP1A AKTIVITET I GJELLER (EROD)	27
3.7	MIKRONUKLEUS I RØDE BLODCELLER.....	28
3.8	SAMMENLIGNING AV RESPONSER.....	29
4	DISKUSJON	32
4.1	EKSPONERING.....	32
4.2	METABOLITTER	33
4.3	CYP1A MRNA FRA LEVER I TORSK	34
4.4	CYP1A PROTEIN I LEVER HOS TORSK (ELISA)	35
4.5	CYP1A AKTIVITET I LEVER (EROD).....	36
4.6	CYP1A AKTIVITET I GJELLENE (EROD)	39
4.7	MIKRONUKLEUS DANNELSE I RØDE BLODCELLER	40
5	OPPSUMMERING OG KONKLUSJON	42
	APPENDIX	43
	REFERANSELISTE	54

Liste over forkortelser

AH	Arabian light høydose
AhR	Aryl hydrokarbon reseptor
AL	Arabian light lavdose
B(a)P	Benzo(a)pyren
BBF+BKF+BJF	Benzo(b)fluoranthene + benzo(j)fluoranthene+ benzo(k)fluoranthene
BSA	Bovin serumalbumin
CYP1A	Cytokrom P4501A
DacA + DahA	Dibenzo(ah)anthracene + dibenzo(ac)anthracene
DCM	Diklormetan
DH	Diesel høydose
DL	Diesel lavdose
DMSO	Dimetylsulfatoksid
EH	Ekofisk høydose
EL	Ekofisk lavdose
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EROD	Etoksyresorufin-O-deetylase
EtOH	Etanol
GAR	Goat anti rabbit
kg	Kilo gram
L	Liter
M	Molar
mg	Milligram
mL	Milliliter
mM	Millimolar
MN	Mikronukleus
mRNA	Messenger ribonukeinsyre
nm	Nanogram
K(ow)	Oktanolvann partifisjonskoeffisient
OH-PAH	PAH metabolitt
PAH	Polysykliske aromatiske hydrokarboner
PCB	Polyklorinerte bifenyl
ppb	Parts per billion
ppm	Parts per million
PVC	Polyvinylklorid
PW	Produksjons vann
RNA	Ribonukleinsyre
rpm	Rounds per minut (runder per minutt)
TTBS	Trisbuffer saline med teen-20
µL	Mikroliter
WAF	Vannløselige fraksjonen av oljen

1 Innledning

Industrilandene har de siste 150 årene hatt en formidabel vekst innen levestandard og forbruk. Denne veksten og dette forbruket har i stor grad blitt mulig som en følge av en tilsynelatende ubegrenset tilgang på billig og lett tilgjengelig olje og naturgass. Svært mange av elementene i vårt daglige liv, som vi er født inn i og vokst opp i, er direkte eller indirekte knyttet til olje. Disse elementene er nærmest usynlige for oss bak et slør av vaner. I en verden der det økonomiske systemet er basert på en kontinuerlig ekspansjon, vil resultatet av disse vanene fortsette å pumpe oljen opp av bakken til toppen er nådd og nedturen begynner. Før den dagen kommer, er det klart at oljen i dag er svært ettertraktet og er en dyrebar ressurs som vil være en iboende del av det industrialiserte samfunnet i lang tid fremover. Og så lenge oljen pumpes opp, vil den måtte transporteres.

Blant annet under transporten av oljen er miljøet sårbart for oljeutslipp ved større og mindre ulykker, samt bevisste utslipp ved for eksempel vasking av tanker. Marin forurensning forårsaket av oljeutslipp av både råolje og raffinerte oljeprodukter kan gi skadevirkninger (Peterson *et al.*, 2003; Martinez-Gomez *et al.*, 2010). Ingen utslipp er like og varierer i størrelser og i utslippenes korttids- og langtidsvirkninger. Ulykker som har fått betydelig oppmerksomhet fra medier og forskere er "Amoco Cadiz" (Bretagne, Frankrike, 1978), Exxon Valdez (Alaska, 1989), "Haven" (Genova, Italia, 1991), "Braer" (Scotland, UK, 1993), "Sea Empress" (Wales, UK, 1996), "Erika" (Bretagne, Frankrike, 1999), "Prestige" (Galicia, Spania, 2002) og "Deepwater Horizon" (Mexicogulfen, USA, 2010). Disse har i første rekke fått oppmerksomhet på grunn av de åpenbare akutte miljømessige konsekvensene, som oljetilslørte kystlinjer med påfølgende død av det lokale dyrelivet og økonomiske konsekvenser, men også på grunn av de varierende og mindre synlige langtidsvirkningene. Slike ulykker og påfølgende forurensning vil utgjøre en risiko for livet i havet langs de viktigste marine transportrutene for olje.

Hvert år transporteres rundt 800 millioner tonn olje til eller fra europeiske havner (EU, 2007). Dette inkluderer Nordsjøen som er et stort olje- og gassproduserende område og har omfattende transport av olje med tankskip og rørledninger. Rundt 70 % av rutene oljetankerne bruker i EU er langs kysten av Atlanterhavet og Nordsjøen, de resterende 30 % er via Middelhavet, noe som gjør disse sonene til de mest sårbare for oljesøl (EU, 2007). Europeiske farvann har i tillegg mange shippingruter for transport av petroleumsprodukter til og fra land utenfor EU. Gjennom Middelhavet kommer det hvert år tusenvis av oljetankere fra Midtøsten via Suez-kanalen. Noen går rundt Sør-Afrika og passerer Gibraltar-stredet med råolje til Europa og Nord-Amerika. Som

en konsekvens av denne store trafikken, øker sannsynligheten for ulykker.

Råolje er ubehandlet olje som finnes dypt under jordens overflate. Den kan variere i farge fra klar til svart og kan finnes i flytende eller fast form. Råoljen pumpes opp fra bakken og lagres på fat for fremtidig raffinering. Vanligvis består råoljer av hydrokarbonforbindelser der de viktigste er de alifatiske, aromatiske og polysykliske aromatiske hydrokarbonene (PAH). PAHer er aromatiske forbindelser laget av to eller flere benzenringer. Det finnes to hovedkategorier av PAHer:

Pyrogene og petrogene. Disse to kategoriene vil i stor grad bestå av ulike PAHer. Utslipp av råolje faller under den petrogene kategorien og er dominert av lavmolekylære PAHer, ofte med overvekt av alkylerte PAHer (Neff, 2002). Pyrogene PAHer dannes ved høye temperaturer gjennom ufullstendig forbrenning, og vil være dominert av fire-, fem- og seksringede PAH (Neff, 2002).

Pyrogene og petrogene PAHer kan oppføre seg forskjellig i miljøet, der pyrogene PAHer ofte vil være mer eller mindre tett bundet til partikler (sot), mens de petrogene PAHene ofte vil være oppløst eller løst bundet til partikler. De petrogene er dermed relativt sett mer tilgjengelige for marine organismer (Thorsen *et al.*, 2004). Jo tyngre og mer hydrofobe PAHene er, jo høyere affinitet har de til å adsorberes til partikulært organisk og uorganisk materiale og kan slik konsentreres i sedimenter.

Overvåking og konsekvensutredning er ofte basert på kjemiske målinger av polysykliske aromatiske hydrokarboner (PAH) i ulike organismer, i sedimenter og i vann. Slike målinger gir derimot ikke informasjon om biotilgjengeligheten og biologisk aktivitet til PAHene, og økotoksikologiske metoder trengs som et supplement til de kjemiske analysene. Ofte er det ønskelig med en hurtig vurdering av skadelige effekter på økosystemer (Wells *et al.*, 2001). I denne sammenheng er bruken av biomarkører (Ross *et al.*, 2002; van der Oost *et al.*, 2003; Sarkar *et al.*, 2006; Schlenk *et al.*, 2008) av stor betydning som mål på effekter på molekulære og cellulære nivåer. Biomarkører er målinger i kroppsvæsker, celler eller vev som indikerer biokjemiske eller cellulære modifikasjoner som en følge av eksponering for giftstoffer (NRC, 1987). Slike målinger er ofte sensitive og kan være et verktøy for ”tidlig varsling” av biologiske effekter (van der Oost *et al.*, 2003). Martínez-Gomez *et al.* (2010) definerte det de anser som de tre viktigste målene for bruken av biomarkører etter et oljeutslipp som; (i) måle toksisiteten til de oljerelaterte forbindelser som en del av risikovurdering; (ii) estimere den geografiske utbredelsen av utslippet samt graden av skade påført de marine økosystemene; (iii) estimere tiden det vil ta før systemet er restituert samt evaluere effekten av eventuelle tiltak.

Bruken av biomarkører har vist å forbedre risikovurderingen for økologien og livet i havet (Eason

og O'Halloran, 2002; Hagger *et al.*, 2006). Studier av oljeutslipp fra Amoco Cadiz, Exxon Valdez, Braer, Sea Empress, Erika og Prestige har tydelig påvist nytten av å anvende biomarkører for eksponering og effekter i konsekvensutredninger ved oljeutslipp (Jewett *et al.*, 2002; Budzinski *et al.*, 2004).

Opptak av PAHer i løsning anses å være korrelert til fettløsligheten til PAHene (K_{ow}), men påvirkes også av alkylering og biotilgjengeligheten til hver komponent (Utvik og Johnsen, 1999; Baussant *et al.*, 2001). Fisk kan ta PAHer direkte opp fra vann eller via føde (Grung *et al.*, 2009), har en effektiv metabolisme og kan lett skille ut de fleste PAHer (van der Oost *et al.*, 2003). Derfor blir PAH metabolitter i galle ofte brukt som mål for individuell eksponering. Gallemetabolitter har vist seg å være et sensitivt mål for eksponering for PAHer, både i forhold til dose og eksponeringens varighet (Hellou og Payne, 1987; Aas *et al.*, 2000; Grung *et al.*, 2009), og pyrenmetabolitter (1-OH-pyren) er tidvis brukt som markør for den totale PAH-metabolismen (Krahn *et al.*, 1987; Ariese *et al.*, 1993).

Leveren er det viktigste organet for xenobiotisk metabolisme i fisk og cytokrom P450 enzymfamilien er ansvarlig for biotransformasjon av en myriade av xenobiotiske forbindelser, inkludert PAHer (Goksøyr og Forlin, 1992; Stegeman og Hahn, 1994). Cytokrom P450 monooksygenase enzymer (CYP) utgjør en superfamilie av strukturelt og funksjonelt relaterte hemproteiner. Disse enzymene er involvert i den oksidative metabolismen av et bredt spekter av substrater deriblant mange organiske miljøgifter, endogene forbindelser som steroider, neurohormoner, fettsyrer og prostaglandiner (Guengerich og Shimada, 1991; Nelson *et al.*, 1996). Cytokrom P4501A (CYP1A) underfamilien har fått mye oppmerksomhet på grunn av sin rolle i biotransformasjon av blant annet dioksiner, furaner, polyklorinerte bifenyler (PCB) og PAHer (for eksempel Stegeman og Hahn, 1994; Parkinson, 2001). CYP1A enzymer kan konvertere lipofile xenobiotika til mer vannløselige metabolitter som et første steg mot utskillelse og detoksifisering. Videre har leveren i fisk relativt høy fettprosent, mellom 40-70 % hos torsk (*Gadus morhua*), som gjør organet mottagelig for akkumulering av fettløselige stoffer (Husøy *et al.*, 1996).

Induksjonen av CYP1A enzymene ved eksponering for xenobiotika, deriblant visse PAHer, er et karakteristisk trekk i fisk og andre vertebrater og noen evertebrater. Aryl hydrokarbon reseptor (AhR) er en ligandaktivert cytosolisk reseptor og binding av dioksinlignende PAHer (ligand) til reseptoren som transporterer AhR-ligand kompleks til cellekjernen og induserer transkripsjon av CYP1A gener (Stegeman og Hahn, 1994). B(a)P er en velkjent genotoksisk PAH (Carls *et al.*, 1999; Nigro *et al.*, 2002) og en velkjent CYP1A induser (Stegeman og Kloeppersams, 1987) gjennom

AhR-veien og kan være toksisk ved svært lave konsentrasjoner (Carls *et al.*, 1999). CYP1A enzymet kan kvantifiseres på genekspressjonsnivå i form av mengde mRNA, eller på proteinnivå i kvantitet eller enzym aktivitet ((Stegeman og Lech, 1991; Goksøyr og Forlin, 1992). I dette studiet ble CYP1A mRNA og CYP1A proteiner kvantifisert i leveren hos torsken, mens måling av CYP1A aktivitet ved ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD), ble målt i lever og gjelle. EROD er en indikator på opptak av PAHer i fisk og er en veletablert *in vivo* biomarkør for eksponering for visse PAHer (Bucheli og Fent, 1995; Stegeman og Hahn 1994).

Biologiske effekter av PAH på fisk omfatter redusert reproduksjonsevne (Johnson *et al.*, 1997; Monteiro *et al.*, 2000), oksidativt stress (Sturve *et al.*, 2006), modifisering av immunforsvaret (Reynaud og Deschaux, 2006), utviklingsmessig toksisitet (Incardona *et al.*, 2006) og genotoksisitet (French *et al.*, 1996; Ericson *et al.*, 1998; Aas *et al.*, 2000). Som mål på genotoksisitet er mikronukleus (MN) test blitt brukt som en indeks for genotoksisitet i over 30 år (Barsiene *et al.*, 2005; Udrouiu, 2006). Røde blodcellene i fisk har cellekjerne og mikronukleus oppstår når et helt kromosom eller kromosomfragmenter unnlater å migrere med en av de to datterkjernene som dannes ved mitose. Disse små sekundære strukturer av kromatin er omgitt av membraner, ligger i cytoplasma og har ingen synlig tilknytning til cellekjernen (Heddle, 1973; Zoll-Moreux og Ferrier, 1999).

Enhver vurdering av toksisitet etter eksponering for olje i akvatiske systemer kompliseres ved at komponentene i oljen samhandler i hvordan de påvirker biologiske systemer. Når råoljer eller raffinerte oljer slippes ut i sjøen vil oljen bli utsatt for flere forskjellige forvitringprosesser. I den innledende fasen etter et oljeutslipp er de viktigste forvitringsprosessene fordampning av de mer flyktige komponentene i oljen, vann-i-olje-emulsion (små vanndråper innklapslet i olje) og det som regnes som den naturlige oppløsningen og blandingen av oljen i vannet. Andre prosesser, som for eksempel fotooksidasjon, biodegradering og sedimentering, påvirker også oljeutslipp (Mackay og McAuliffe, 1989). Alle disse forvitringsprosessene skjer samtidig, men i hvilken grad disse prosessene påvirker oljen, avhenger av oljens kjemiske og fysiske egenskaper sammen med de rådende værforholdene som temperatur og sjøgang. Endringene i oljens egenskaper som en følge av forvitring, kan ha en betydelig innflytelse på bekjempelse av oljesøl. Råoljer bør derfor analyseres for bedre prediksjon av oljens oppførsel og effekter i marine miljøer. Slike data kan være verdifulle både i planleggingen av oljevernberedskapen og tilrettelegging av oppryddingsarbeid (Mackay og McAuliffe, 1989; Nordvik, 1995).

Den vannløselige fraksjonen (WAF) av oljen (for eksempel benzener, toulener, naftalener, PAH, fenoler og polare komponenter) er forbindelser med høy biotilgjengelighet for marine organismer. WAF vil være forskjellige fra oljetype til oljetype og WAF er relevant både for akutte oljeutslipp og regelmessige utslipp (kronisk) for å studere effekter av toksisitet (SINTEF, 2010). Organismer eksponert *in vitro* for WAF kan gjennomføres i statiske systemer eller i et gjennomstrømningssystem der WAF blir kontinuerlig laget.

Der det er mulig, bør en benytte modellorganismer der biologisk effektteknikker er godt dokumentert, som er geografisk relevant og har en vid utbredelse i de aktuelle områdene samt relativt enkle å prøveta (Pietrapiana *et al.*, 2002; Budzinski *et al.*, 2004; Martinez-Gomez *et al.*, 2006). Skrubbe (*Platichthys flesus*), sandflyndre (*Limanda limanda*), torsk (*Gadus morhua*) og mulle (*Mugilidae*) brukes rutinemessig i overvåkningsprogrammer for vurdering av forurensning langs kysten av vesteuropa (Martinez-Gomez *et al.*, 2010). Torsk, som ble brukt i denne oppgaven, er en økonomisk viktig marin fisk i Atlanterhavet og Barentshavet.

Målet med denne oppgaven var å kvantifisere eventuelle effekter av *in vivo* eksponering for to råoljer og skipsdiesel på juvenil torsk.

Hovedmålet kan inndeles i følgende delmål:

1. Kvantifisere eventuelle endringer i fase-1 cytokrom P450 1A protein fra lever og cytokrom P450 1A protein aktivitet i gjelle relatert til eksponering for forvitrede oljer og skipsdiesel.
2. Kvantifisere eventuelle endringer i frekvens av mikronukleusdannelse i røde blodlegemer relatert til eksponering for forvitret olje eller skipsdiesel.
3. Undersøke dose-avhengig biologiske responser hos juvenil torsk ved eksponering for forskjellige konsentrasjoner av forvitret olje eller skipsdiesel.

Som biomarkører ble det målt nivåer av cytokrom P4501A proteiner i lever, aktiviteten til cytokrom P4501A i gjeller samt dannelsen av mikronukleus i røde blodceller, for effekten av PAH. Ytterligere biomarkører brukt av samarbeidspartene i prosjektet målte nivåer av PAH metabolitter fra gallen, cytokrom P4501A mRNA ekspresjon i lever og cytokrom P4501A aktiviteten i leveren fra torsken.

2 Materialer og metode

2.1 Olje og behandlinger

Tre oljetyper ble brukt i forsøket (i) Arabian light, en råolje fra Saudi Arabia (ii) Ekofisk, en råolje fra Nordsjøen og (iii) skipsdiesel fra Universitetets forskningsfartøy Trygve Braarud.

Tabell 2.1 Kjemisk analyse av oljetypene, data fra Consejo Superior De Investigaciones Científicas (CSIC), Spania.

Innhold	Arabian light	Ekofisk	Diesel
Alifatiske hydrokarboner	40,4	62	16
Aromatiske hydrokarboner	33,8	13	55
Resiner	21,7	8	12
Asfaltener	4,1	2,1	7,0

Oljene og dieselen ble utsatt for kunstig forvitring etter Smith *et al.* (2005) i forkant av eksponeringen. Oljene og dieselen ble blandet 1:1 (v/v) med sjøvann og satt på røring med magnetrører i 24 timer. Etter 24 timer ble magnetrørern slått av og olje/diesel-sjøvannblandingen fikk hvile i 1 time slik at vann og olje skiltes fra hverandre. Målte ut lav- og høydoseringer på henholdsvis 2 mL og 6 mL olje og diesel pr kg grus (akvariegrus av jevn størrelse, 4-5 mm). Oljen ble deretter blandet ut i diklormetan i forholdet 2:1 (olje:DCM) for å kunne forsørge jevn fordeling av oljen i grusen. Grusen ble deretter satt i avtrekksskap i 24 timer for å dampe bort DCM fra grusen.

2.2 Forsøksorganisme

Fisken benyttet i forsøket var juvenil oppdrettstorsk kjøpt fra Profunda AS (Barstadvik, Norge). Fiskene var opptil seks måneder gamle, gjennomsnittslengden var 17,9 cm (min: 16,3 cm; maks: 20,5 cm) og gjennomsnittsvekten var 48,4 g (min: 30,47 g; maks: 69,74 g). Til sammen ble 64 torsk (tabell 2.1) eksponert for den vannløslige fraksjonen av oljen (WAF) i et gjennomstrømningssystem.

Tabell 2.2 Behandlinger, konsentrasjoner, replikater og antall torsk brukt i eksperimentet for hver oljebehandling (lav-/høydose), kontroll og "0"-gruppe.

Behandling	Konsentrasjoner	Replikater	Antall fisk per replikat	Sum
Arabian light	2	4	2	16
Ekofisk	2	4	2	16
Diesel	2	4	2	16
Kontrollgruppe	1	4	2	8
"0"-gruppe	1	8	1	8
Sum fisk benyttet				64

2.3 Eksponering

Forsøket ble utført på Biologisk stasjon, Universitetet i Oslo, i Drøbak, i perioden oktober til desember 2009. Selve eksponeringen varte fra 26.11.09 til 17.12.09 der første prøvetagning var 03.12.09, andre og siste 17.12.09. Et gjennomstrømningssystem ble bygget (Fig 2.1) hvor rent vann fra 34 meters dyp i Drøbaksundet ble pumpet inn til en headertank (3) hvorfra vannet ble distribuert videre til hvert sitt akvarium (1). Hvert akvarium rommet 20 L (230x360x260 mm) og en mørk ugjennomsiktig plate ble plassert mellom hvert akvarium for å begrense visuelle forstyrrelser. "0"-prøvefisken gikk i en separat tank under hele eksperimentet og ble prøvetatt to dager etter siste prøvetagning (3 uker + 2 dager). Eksponeringen ble gjennomført med to torsk pr akvarium. Peristaltiske pumper (Watson-Marlow 520S) (2) fraktet vannet fra headertanken til akvariene gjennom 28 kolonner (4) (45 cm høyde, 10 cm diameter). Hver av kolonnene inneholdt oljeholdig grus med sine respektive behandlinger, en lav- og en høydose av hver olje- og dieseltipe; Arabian light lavdose (AL) og Arabian light høydose (AH), Ekofisk lavdose (EL) og Ekofisk høydose (EH), Diesel lavdose (DL) og Diesel høydose (DH). Mellom headertanken og kolonnene ble vannet fraktet via myke PVC silikonslanger og fra kolonnene til akvariene via teflonslanger for å forhindre adsorpsjon av olje i slangen. For å tilse jevn fordeling og forhindre et oljelokk på vannoverflaten, ble slangene plassert halvveis ned i akvariene.

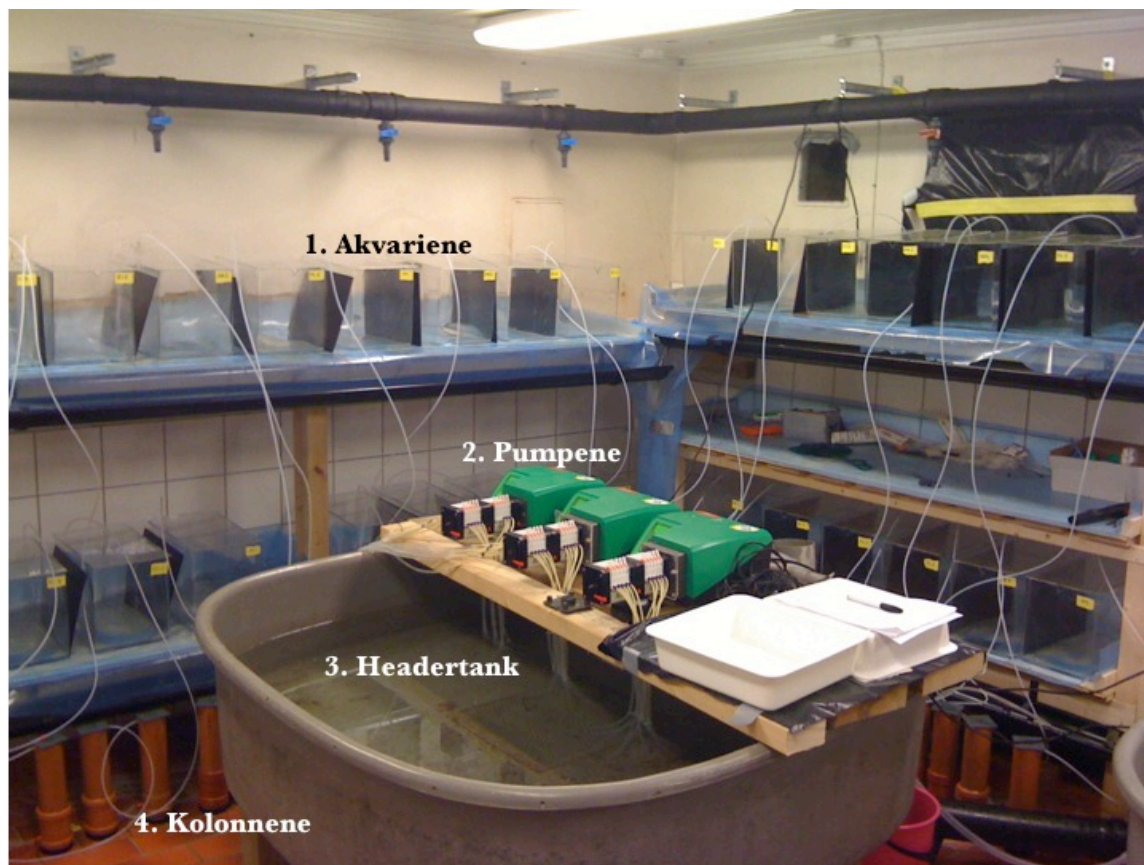


Fig 2.1 Ferdigrigget system. Numerert tekst i bildet navngir sentrale elementer av eksperimentet, nevnt i teksten over.

Systemet hadde en gjennomsnittlig flow gjennom hver kolonne og inn i hvert akvarium, på ≈ 48 mL/min (45-50 mL/min). Hvert akvarium ble fullstendig utskiftet med vann hver ≈ 7 time (t) ($20\text{L}/0,048\text{L} = 417$; $417/60 \text{ min} \approx 7\text{t}$). Videre ble hvert akvarium fullstendig utskiftet vann ≈ 24 ganger etter en uke ($24\text{t} * 7 = 168 \text{ t}$; $168\text{t}/7\text{t} = 24$) og ≈ 72 ganger etter tre uker ($24\text{t} * 168 = 504\text{t}$; $504\text{t}/7\text{t} = 72$). Det ble daglig pumpet $\approx 68,5$ L gjennom hver kolonne ($7\text{t} \approx 20 \text{ L vann}$; $247/7\text{t} = 3,43$; $3,43 * 20 \text{ L} = 68,5 \text{ L}$) og til sammen, gjennom hele systemet etter tre uker, var det blitt pumpet ≈ 3836 L vann ($68,5 \text{ L} * 56$ (behandlinger + replikater) = 3836 L). Hver kolonne inneholdt 650 g grus. Lavdose behandlingene inneholdt 2 g olje/kg grus, mens høydosene 6 g olje/kg grus.

2.4 Prøvetaking

All fisk ble bedøvet med tricaine (MS-222; 0,5 g/L) før lengde og vekt ble bestemt. Blodprøver ble tatt fra kaudalvenen med en sprøyte (0,6 mm) forbehandlet med antikoaguleringsmiddelet heparin. Blodet ble brukt til blodstryk ved å dryppe en liten dråpe midt på objektglasset, ca 0,5 cm fra håndterings enden. Et nytt objektglass ble brukt som utstryksglass. Utstryksglasset ble satt ned på objektglasset i en 30-60 graders vinkel og trukket tilbake til bloddråpen slik at bloddråpen ble

spreddt ut i utstryksglassets fulle bredde. Utstryksglasset ble skjøvet fremover i en jevn, hurtig bevegelse og etterlot blodet i et tynt og relativt jevnt fordelt lag på objektglasset. Objektglassene med blodstryk ble lufttørket og senere plassert i oppbevaringsbokser for objektglass.

Gjellebuene på høyre side av fiskene ble skåret ut med skalpell og umiddelbart lagt i kald Hepes-Courtland buffer (0.38 g KCl, 7.74 g NaCl, 0.23 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.23 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.41 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.43 g HEPES, og 1 g glukose per 1 L dH_2O ; pH justert til 7.7 med NaOH) for umiddelbar etoksyresorufin-O-deetylase (EROD) analyse. Deretter ble buken på fisken snittet opp med skalpell og galleprøver tatt med sprøyter (0,5mm) og frosset på -20°C . Prøvene ble beskyttet mot lys med aluminiumsfolie. Leveren ble dissekert ut, veid og delt i tre parallelle prøver. Samtlige prøver ble frosset ned i kryorør på flytende nitrogen. Alt innsamlet materiale ble merket med tallkoder slik at prøvene kunne randomiseres når analysene skulle gjennomføres.

2.5 Vannprøver

150 mL vannprøver ble tatt etter 1 og 3 ukers eksponering fra 3 replikater av hver behandling. Prøvene ble oppbevart på mørke glass i -20°C fryser før de kjemiske analysene. Vannprøvene ble analysert for PAHer og inkluderte alykerte PAHer og aromatiske substanser med svovelgrupper etter metode beskrevet av Budzinski *et al.* (2004). PAH ble kvantifisert ved hjelp av interne standarder Baumard *et al.* (1999).

2.6 Opparbeiding av lever

Leveren ble opparbeidet etter metoden beskrevet av Dignam (1990). Leverprøvene ble tint på is før de ble veid, overført til homogeniseringsrør og tilsatt homogeniseringsbuffer (0,1 M KH_2PO_4 ; pH 7,8; 0,5 M K_2PO_4 ; 0,15 M KCl; 1 mM DTT (dithiotreitol); 5 % Glycerol) til et totalvolum på 5 mL. For leverprøver under 0,7 g ble totalvolumet justert til 2,5 mL. Prøvene ble deretter homogenisert på is ved hjelp av en fastmontert motorisert drill (Janke & Kunkel drill, Potter-Elvehjem metoden) med teflon pistill. Homogeniseringsrøret med de små prøvene ($<0,7$) ble ført opp og ned 15 ganger og de store prøvene ($>0,7$ g) 20 ganger.

Deretter ble prøvene sentrifugert ved $10000 \times g$ ved 4°C i 30 minutter på en ultrasentrifuge (Sorvall MTX 150 Microultra). Supernatanten ble forsiktig overført til et nytt sentrifugerør med pastaupipetter. Pelleten og fettene ble kastet. Supernatanten ble deretter sentrifugert ved $100000 \times g$ ved 4°C i 60 minutter. Supernatanten etter denne sentrifugeringen skulle ikke benyttes videre i forsøket og ble kastet. Pelleten, som inneholder mikrosomene, ble resuspendert i 200 μL kald

mikrosomalbuffer (homogeniseringsbuffer; 1mM etylendiamintetraeddiksyre (EDTA); 20% glyserol) og homogenisert med glasspistill på is ved å føre homogeniseringsstaven opp og ned 15 ganger per prøve. Prøvene ble fordelt i eppendorfrør og frosset ned til -80° C.

2.7 Proteiner i lever

Alle leverprøver ble analysert for proteiner etter metode av Lowry *et al.* (1951). En standardrekke ble laget av bovin gammaglobulin (0,2mg/mL til 1,5mg/mL) fortynnet i tris-buffer (0,1 M; pH 8,0). Opparbeidet leverprøver ble tint på is, fortynnet for å tilpasses standardkurven og avsatt i triplikater i en 96-brønns mikrotiterplate (Sarstedt).

Videre ble 25 µl reagens A (alkalisk kobber tartarløsning) og 200 µl reagens B (fortynnet Folin's reagens) tilsatt hver brønn. Hver plate ble forsiktig rotert for hånd for å blande reagensene. Deretter ble brettene inkubert i 15 minutter i romtemperatur før absorbans umiddelbart ble avlest på 750 nm i plateleser (Biotek SynergyMx).

Standardkurve ble laget på bakgrunn av fortynnede proteinstandarder og proteinkonsentrasjonen ble beregnet i prøvene.

2.8 CYP1A aktivitet i gjelle med etoksyresorufin-O-deetylase (EROD)

EROD-analysen ble gjennomført i et rom med dempet belysning. Først ble gjellebuene med 35 ± 2 gjellefilamenter ble lagt i reaksjonsbrønnene på en 24-brønners mikrotiterplate som inneholdt 0,5 mL temperert buffer (HEPES-Courtland buffer, pH 7,7)

Denne bufferløsningen ble så skiftet ut med 500 µL EROD-buffer (HEPES-Courtland buffer; 1 µL 1 mM dicumarol; 20 µL 10 mM etoksy-resorufin løst i DMSO). Etter 2 minutter ble bufferen skiftet ut med nye 500µL EROD-buffer og starttidspunkt notert. Etter 30 minutter ble reaksjonen stoppet ved overføring av 2 x 200µL av EROD-bufferen fra hver av reaksjonsbrønnene til en 96-brønns mikrotiterplate. Fluorescens ble avlest på plateleser (Biotek FLx800) ved bølgelengder 535 nm (eksitasjon) og 585 nm (emisjon).

2.9 Gallemetabolitter

Galle fra galleblæren til torsken ble tatt med sprøyter (0,5 mm) og umiddelbart frosset på -20 °C. Prøvene ble beskyttet mot lys med aluminiumsfolie. Galleprøvene ble analysert for metabolitter

etter metode av Le Dû-Lacoste *et al.* (2008) basert på ultra-trykks væskeskromatografi (Ultra Pressure Liquid Chromatography) koplet til tandem massespektrometri (UPLC / MS / MS). Analysene ble gjennomført av Universitetet i Bordeaux.

2.10 CYP1A mRNA fra lever

mRNA ekspresjonen av cytochrom P450 1A (CYP1A) ble målt i fisk fra alle behandlinger inkludert alle replikater. RNA ekstraksjon ble gjennomført av NIVA (Norsk Institutt for Vannforskning) med E.Z.N.A.® Total RNA Kit fra Omega Biotek. Precellys (Bertin Technologies, Versailles, France) homogeniserte leverprøver i 3x10 sek, 5500 rpm i 96% etanol (EtOH) før sentrifugert 2 min 10k g. Overførte deretter supernatant til nytt rør, tilsatte 400 µL lysisbuffer (fra RNA kit) til kuler og vevspellet. Homogenisert i 3x10 sek, 5500 rpm og sentrifugert 2 min 10k g. Supernatanten ble overført til nytt rør, tilsatte EtOH for felling (1:1) og applisert på kolonner. Etter vasking av kolonnene ble RNA eluert i RNase-fritt vann. Syntese av cDNA ble utført ved bruk av high-capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) etter produsentens protokoll.

For PCR ble det brukt Qanta PerfeCta sybrgreen supermix with low ROX (Quanta Biosciences, Gaithersburg, USA) i 96-brønns plater på et 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Primersekvenser benyttet for CYP1A:

F: CCAACTTACCTCTGCTGGAAGC (B. Rees *et al.*, 2003)

R: GGTGAACGGCAGGAAGGA (B. Rees *et al.*, 2003)

60 °C ble benyttet som annealingtemperatur.

2.11 CYP1A kvantitet (ELISA) i lever

For kvantifisering av cytochrom P450 1A protein i homogenisert levervev ble enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) metoden benyttet (Goksøyr, 1991). Mikrosomene fra opparbeidingen av leverprøvene ble fortynnet til 10 µg protein mL⁻¹ i coatingbuffer (karbonat-bikarbonat; 0,05M; pH 9,6 ved 25 °C). Et større volum av en prøve (nr 23) ble laget for å virke som intern referanse på alle brett (NUNC immuno 96 MicroWell). Pipeterte 100 µL coatingbuffer, 100 µL referanseprøve og 100 µL av fortynnet prøveløsning for prøvene til brettene. Brettene ble inkubert mørkt under forsegling ved 4 °C i 18 timer ± 1,5 timer.

Brettene ble deretter vasket tre ganger (SkanWasher300) i TTBS (8,84 g Trizma HCl, 17,44 g Trizma Base, 292 g NaCl, 5 mL Tween-20 per 10 L dH₂O), tilsatt 300 µL blokkeringsbuffer

(TTBS med 1% Bovint serumalbumin (BSA)) med multipipette til alle brønner, inkubert mørkt ved romtemperatur i 37 minutter før brettene igjen ble vasket 3 ganger med TTBS. 100 µL primærantistoff (anti-fisk CYP1A - CP226) fortynnet 1:1000 i antistoffbuffer (TTBS; 0,1 % BSA) ble deretter pipettert med multipipette til alle brønnene før brettene ble forsegle og inkubert over natten (22 timer) ved 4 °C. Dagen etter ble brettene vasket 3 ganger med TTBS før 100 µL sekundærantistoff (goat-anti rabbit – GAR) fortynnet 1:3000 i antistoffbuffer ble pipettert med multipipette til alle brønnene. Brettene ble forsegle og inkubert ved 4 °C i 6 timer. Brettene ble deretter vasket 5 ganger med TTBS, tilsatt 100µL TMB og inkubert mørkt ved romtemperatur i 15,45 minutter ± 10 sekunder før reaksjonen ble stoppet med 50 µL 1M (2N) H₂SO₄ i alle brønnene. Absorbansen ble avlest med en plateleser (Biotek synergyMx) ved 450nm.

Alle brett ble behandlet forsiktig og pipetteringene ble utført mot bunnen av brønnene med så lite berøring av selve brønnene med pipettespissene som mulig.

2.12 CYP1A aktivitet i lever (EROD)

Cytokrom P450 1A aktivitet i leveren til torsken ble mål i EROD for å danne produktet resorufin (EROD) etter Galgani og Payne (1991) og Bruke og Mayer (1974). Analysen ble utført av IFREMER, Nantes.

2.13 Mikronukleus i røde blodceller

Objektglassene med blodstryk ble fiksert i et metanol:edikksyre-bad (3:1) i 5 minutter før de ble tatt opp og lufttørket. DNA på de fikserte objektglassene ble så farget i et vannbad med 3% giemsa i 40 minutter. Objektglassene ble deretter vasket i to rene vannbad før de ble lufttørket.

Påfølgende dag ble dekkglass limt (Eukitt lim) på objektglassene. Limet mellom objektglasset og dekkglasset ble presset jevnt utover for å unngå ujevnheter og luftbobler. Objektglassene ble deretter lufttørket til neste dag.

Et minimum på 5000 celler ble telt per fisk ved at de ferdige objektglassene ble lagt under mikroskop (Olympus BX41), immersjons olje dryppet på objektglassets overside og minimum analysert under 100x forstørrelse. For nærmere studier av cellene og bekreftelse av MN formasjoner, ble 400x forstørrelse benyttet.

2.14 Statistiske metoder

Alle data testet for homogen varians ved hjelp av Levenes test (Levene, 1960). I tilfeller med homogen varians ble det gjennomført enveis variansanalyse (ANOVA) med signifikansnivå $\alpha \leq 0,05$ (Cowles og Davis, 1982; Zar, 2010). Ved signifikant ulikhet mellom behandlinger, ble ANOVA ettertestet med Dunnets metode med kontroll med signifikansnivå $\alpha \leq 0,05$ (Dunnett, 1955). I test av "0"-prøver mot kontrollgruppene ble t-test benyttet (Zar, 2010). I tilfeller av ulik varians, ble dataene log10-transformert og testet for homogen varians igjen. I tilfeller hvor variansen fortsatt var ulik, ble dataene analysert med ikke-parametrisk Kruskal-Wallis test med signifikansnivå $\alpha \leq 0,05$ (Zar 2010). For å etterteste ulikhet mellom behandlinger, ble Kruskal-Wallis test ettertestet med Dunns metode mot kontroll med signifikansnivå $\alpha \leq 0,05$ (Dunn, 1964).

Mikronukleus ble grafisk presentert i et mosaikk-plot og representerer dataene fra en kontingenstabell. Mosaikk-plottet er delt inn i rektangler der størrelse av rektanglene er proposjonert etter faktorene testet.

Korrelasjoner mellom biomarkørene ble testet med Spearmans P ($\alpha \leq 0,05$) (Siegel, 1957). Statistiske analyser ble utført ved hjelp av JMP ® 9.0.0 (9.0) (SAS Institute Inc.) og GraphPad Prism 5,0d for Mac OS X (GraphPad Software, Inc.).

3 Resultater

3.1 Konsentrasjon i vann

Etter en ukes eksponering var det forhøyede nivåer av summen av PAHer (Σ PAH + Σ alkylerte PAH) i vannet til torsken fra alle behandlinger i forhold til vannet fra kontrollfisk. Summen av PAHer fordelte seg i et konsentrasjonsavhengig mønster. Total konsentrasjon av PAHer i vannet fra behandlingene med lave olje- og dieselskonsentrasjoner hadde ~ 6 (EL), ~ 7 (DL) og ~ 10 (AL) ganger høyere nivåer av PAHer i forhold til vannet fra kontrollfisk. Total konsentrasjon av PAHer i vannet fra behandlingene med høye olje- og dieselskonsentrasjoner hadde ~ 30 (AH), ~ 33 (EH) og ~ 60 (DH) ganger høyere nivåer av PAHer i vannet i forhold til vannet fra kontrollfisk. De 2-ringede metylnaftalenene dominerte PAHene i vannet med gjennomsnittlig 85% av alle PAHene i Arabian light behandlingene, 86% av PAHene i Ekofisk behandlingene og 91% av alle PAHene i diesel behandlingene (tabell 3.1). De større PAHene, som fluoranten, pyren og benzo(a)pyren (B(a)P) (med flere) hadde lave relative bidrag til summen av PAHene og noen lot seg ikke detektere. Gjennomsnittlige verdier ble utregnet for hver behandling (DH: $n = 1$; AL: $n = 2$; kontroll, AH, EL, EH, DL: $n = 3$).

Etter tre uker var det en generell nedgang i summen PAHer i vannet. Nedgangen lå på mellom 1,1 ganger (f.eks. krysen + trifenylylkrysen) til 209 ganger (dibenzotiofen) mindre fra uke en til uke tre. Etter tre uker utgjorde de 2-ringede metylnaftalenene og de 3-ringede metylfenantrenene gjennomsnittlig 81% og 9% i Arabian light behandlingene, 70% og 6% i Ekofisk behandlingene og 68% og 14% i diesel behandlingene (tabell 3.2). Etter tre uker var det også en større relativ andel av de tyngre PAHene (for eksempel fluoranten og pyren) i vannet enn etter 1 uke. Utover dette fantes det unntak fra den relative nedgangen (for eksempel acenaftylen i EH, DL og DH). Gjennomsnittlige verdier ble utregnet for hver behandling (kontroll: $n = 2$; AL, AH, EL, EH, DL DH: $n = 3$).

Tabell 3.1 Gjennomsnittlige konsentrasjoner etter en uke av polysykliske aromatiske hydrokarboner (ng/l vann) i vannet fra behandlingene Kontroll, Arabian Light lav- og høydose (AL, AH), Ekofisk lav- og høydose (EL, EH), Diesel lav- og høydose (DL, DH) etter en og tre ukers eksponering. n = 3 i alle behandlinger. Nd = not detected (ikke detektert). Σ metylnaftalen inkluderer: mono-, di-, tri og tetrametylnaftalen. Σ metyldibenzotiopen inkluderer: mono-, di-, tri- og tetrametyldibenzotiophen. Σ alle metylfenantren inkluderer: mono-, di- og trimetylphenantren. Σ metylkrysen inkluderer: samtlige metylkryser. Analysene av vannprøvene ble gjort ved Université Bordeaux, Frankrike (Hélène Budzinski).

En uke

PAHer (ng/l vann)	Kontroll	Arabian light Lav	Arabian light Høy	Ekofisk Lav	Ekofisk Høy	Diesel Lav	Diesel Høy
Phenanthren	1,5	4,3	10,4	3,7	26,4	3,3	33,8
Anthracene	0,5	0,4	1,0	0,4	1,8	0,7	3,2
Acenaphthylene	nd	nd	nd	0,8	1,4	0,4	1,3
Acenaphthene	0,5	1,0	2,0	1,7	10,5	3,3	24,7
Fluorene	1,3	2,4	9,3	3,7	46,0	7,9	113,6
Fluoranthene	0,6	1,2	0,7	0,9	1,6	0,9	2,5
Pyren	0,7	1,8	1,3	2,5	4,2	1,9	5,1
Benzo(a)anthracene	0,6	0,4	0,3	0,5	0,3	0,3	0,3
Chrysene + Triphenylchrysene	0,7	1,3	1,1	5,0	5,4	0,7	1,1
Benzo(a)pyren	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BBF+BKF+BJF	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Benzo(e)pyren	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Perylen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ideno(1, 2, 3 c-d)pyren	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
DacA + DahA	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Σ PAH	6,3	12,8	26,1	19,1	97,7	19,5	185,5
Alkylerte PAH (ng/l vann)							
2,1 benzonafiotiopen	0,6	2,2	2,0	1,0	0,8	0,3	0,2
Dibenzotiopen	0,8	11,9	55,5	0,9	8,5	0,9	2,0
Σ Metylnaftalen	83,6	869,1	2694,1	488,3	3072,1	657,3	5784,2
Σ Metyldibenzotiopen	1,2	74,8	189,6	5,1	23,3	2,9	4,1
Σ Metylphenantren	12,2	88,9	144,6	109,1	291,9	83,0	349,2
Σ Metylkrysen	nd	0,5	0,7	3,0	3,6	0,4	0,4
Σ alkylerte PAHer	98,4	1047,4	3086,5	607,4	3400,1	744,9	6140,1

Figur 3.2 Gjennomsnittlige konsentrasjoner etter tre uker av polysykliske aromatiske hydrokarboner (ng/l vann) i vannet fra behandlingene Kontroll, Arabian Light lav- og høydose (AL, AH), Ekofisk lav- og høydose (EL, EH), Diesel lav- og høydose (DL, DH) etter en og tre ukers eksponering. n = 3 i alle behandlinger. nd = not detected (ikke detektert). Σ metylnaftalen inkluderer: mono-, di-, tri og tetrametylnaftalen. Σ metyldibenzotiopen inkluderer: mono-, di-, tri- og tetrametyldibenzotiopen. Σ alle metylfenantren inkluderer: mono-, di- og trimetylphenantren. Σ metylkrysen inkluderer: samtlige metylkryser. Analysene av vannprøvene ble gjort ved Université Bordeaux, Frankrike (Hélène Budzinski).

Tre uker	Kontroll	Arabian light Lav	Arabian light Høy	Ekofisk Lav	Ekofisk Høy	Diesel Lav	Diesel Høy
PAH (ng/l vann)							
Fenantren	2,3	2,6	2,9	2,0	2,6	1,9	3,8
Antracen	0,5	nd	nd	nd	0,5	0,7	nd
Acenaftylen	nd	1,3	1,1	0,8	1,5	0,7	1,6
Acenaften	0,7	1,0	1,0	0,8	0,9	nd	0,7
Fluoren	0,7	1,1	1,0	0,6	0,9	1,0	1,8
Fluoranten	0,8	0,6	0,6	0,7	0,7	0,8	1,0
Pyren	0,6	0,6	0,6	0,6	1,3	0,7	0,8
Benzo(a)antracen	0,2	0,4	nd	nd	0,1	0,3	nd
Krysene +Trifenylen	0,3	nd	1,0	2,1	4,3	0,4	0,7
Benzo(a)pyren	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BBF+BKF+BJF	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Benzo(e)pyren	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Perylen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Indeno(1, 2, 3 c-d)pyren	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
DacA + DahA	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Σ PAH	5,9	7,6	8,3	7,6	12,9	6,6	10,3
Alkylerte PAH (ng/l vann)							
2,1 benzonaftotiopen	nd	0,4	nd	nd	0,5	nd	nd
Dibenzothiophene	nd	0,4	0,3	0,2	0,4	nd	0,5
Σ Metylnaftalen	55,4	67,2	83,7	43,5	71,1	68,9	47,2
Σ Metyldibenzotiopen	nd	1,0	1,4	nd	1,0	nd	nd
Σ Metylphenantren	3,0	8,7	7,7	2,0	20,4	14,7	22,6
Σ Metylkrysen	nd	nd	nd	nd	3,6	nd	nd
Σ alkylerte PAHer	58,5	77,7	93,1	45,6	97,0	83,6	70,3

3.2 Galle-metabolitter av polysykliske aromatiske hydrokarboner

Etter en ukes eksponering var det forhøyet konsentrasjon av Σ OH-PAH i torsk fra alle behandlinger i forhold til fisk fra kontrollgruppen. Σ OH-PAH fordelte seg i konsentrasjonsavhengige mønstre (tabell 3.3).

Etter tre ukers eksponering var det lavere nivåer av Σ OH-PAH i gallen enn etter en ukes eksponering (tabell 3.4) og Σ OH-PAH fordelte seg i et konsentrasjonsavhengig mønster.

I ”0”-prøvefiskene (tabell 3.5) var det lave nivåer av PAH-metabolitter sammenlignet med samtlige behandlinger og var nærliggende nivået til kontrollfiskene.

Naftalenene utgjorde gjennomsnittlig mellom 73% (tre uker) og 87% (en uke) av PAHene i vannet, men kun gjennomsnittlig mellom 2% (tre uker) og 5% (en uke) av metabolittene. B(a)P var ikke tilstede i detekterbare nivåer i vannprøvene, men ble funnet som metabolitter i galleprøvene og utgjorde gjennomsnittlig 4% til 11% av metabolittene.

Tabell 3.3 Gjennomsnitt av gallemetabolitter fra kontrollfiskene og behandlingene Arabian light lav- og høydose, Ekofisk lav- og høydose, diesel lav- og høydose etter en ukes eksponering.

En uke

PAH metabolitt (ng/g galle)	Kontroll	Arabian light Lav	Arabian light Høy	Ekofisk Lav	Ekofisk Høy	Diesel Lav	Diesel Høy
2 OH-Bifenyl	8,3	24,4	36,6	9,7	18,0	1,4	24,1
3-OH-Fluoren	44,2	19,0	nd	6,6	27,4	42,4	55,3
1-OH-Pyren	111,8	346,5	622,4	334,2	784,4	840,2	1021,1
1-OH-Krysen	14,7	31,2	30,4	45,5	90,3	23,4	29,1
Σ OH-Fenantren	131,6	232,2	199,1	375,3	869,0	1281,4	1008,0
Σ OH-Benzo(a)Pyren	22,4	35,9	60,3	36,5	125,2	6,2	12,5
Σ OH-Naftalen	43,6	43,1	36,9	39,3	115,8	42,1	200,0
Σ OH-PAH	376,6	732,4	985,6	847,1	2030,0	2236,9	2350,1

Tabell 3.4 Gjennomsnitt av gallemetabolitter fra kontrollfiskene og behandlingene Arabian light lav- og høydose, Ekofisk lav- og høydose, diesel lav- og høydose etter tre ukers eksponering.

Tre uker

PAH metabolitt (ng/g galle)	Kontroll	Arabian light Lav	Arabian light Høy	Ekofisk Lav	Ekofisk Høy	Diesel Lav	Diesel Høy
2 OH-Bifenyl	18,3	6,4	20,2	39,7	30,7	8,1	10,6
3-OH-Fluoren	44,3	0,9	8,8	3,3	9,2	14,9	10,1
1-OH-Pyren	125,1	37,1	78,5	124,4	190,0	445,0	319,4
1-OH-Krysen	14,8	17,6	27,2	66,0	121,4	20,3	14,2
Σ OH-Fenantren	164,9	15,5	77,3	31,1	611,3	136,8	200,4
Σ OH-Benzo(a)Pyren	31,9	22,8	34,8	76,2	138,7	12,8	24,5
Σ OH-Naftalen	47,1	0,7	4,9	6,1	54,8	4,6	8,7
Σ OH-PAH	446,4	100,9	251,9	346,8	1156,1	642,5	587,9

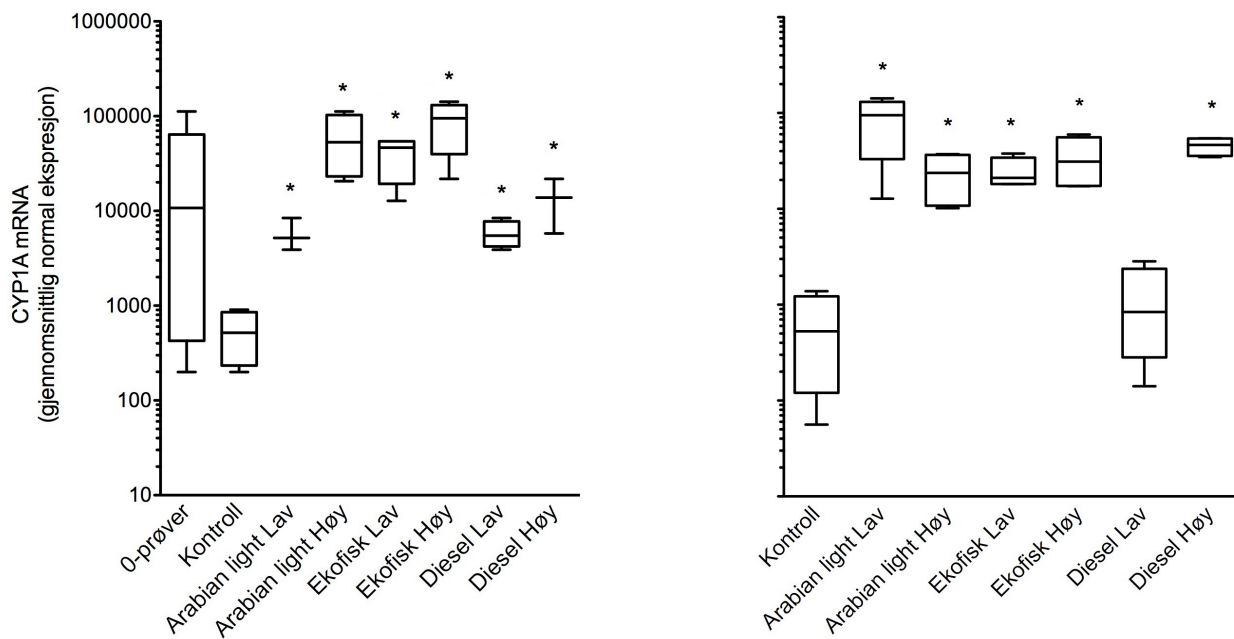
Tabell 3.5 Gjennomsnitt av gallemetabolitter fra "0"-prøvefisk.

PAH metabolitt (ng/g galle)	
2 OH-Bifeny	1,4
3-OH-Fluoren	31,8
1-OH-Pyren	89,7
1-OH-Krysen	8,9
Σ OH-Fenantren	29,1
Σ OH-Benzo(a)Pyren	50,2
Σ OH-Naftalen	4,0
Σ OH-PAH	215,1

3.3 CYP1A mRNA i lever

Det var stor variasjon i mengder CYP1A mRNA fra leveren til "0"-prøvefisk (10700; 400-64000) i forhold til kontrollfisk (500: 200-900). Det var ingen signifikant forskjell i mengde CYP1A mRNA fra leveren til "0"-prøvefisk og kontrollfisk etter en ukes eksponering. Det var signifikante forskjeller i CYP1A mRNA mellom behandlingene (kontroll, AL, AH, EL, EH, DL, DH) (ANOVA, $p < 0,0001$) (figur 3.1, venstre). CYP1A mRNA nivåene i leveren til torsk fra AL, AH og EL var signifikant forskjellige fra nivåene i leveren til kontrollfisk, alle med $p < 0,0001$ (Dunnets). CYP1A mRNA nivåene i leveren til torsk fra EH, DL og DH var signifikant forskjellige fra leveren til kontrollfisk med henholdsvis $p = 0,0002$, $p = 0,0003$ og $p = 0,0007$ (Dunnets). Medianverdiene for CYP1A mRNA i leveren til torsk i behandlingene AL (5200; 3900-8400), AH (53000; 23200-102900), EL (46500; 19300-54300), EH (94900; 39800-130700), DL (5500; 4200-7800) og DH (13800; 5800-21800) var mellom 10 (AL) og 183 (EL) ganger så høy som medianverdien til kontrollfisk.

Det var ingen signifikant forskjell mellom "0"-prøvefisk og kontrollfisk i mengde CYP1A mRNA etter tre ukers eksponering. Det var signifikante forskjeller mellom behandlingene (kontroll, AL, AH, EL, EH, DL, DH) (ANOVA, $p < 0,001$) (fig 3.1, høyre). Etter tre uker var CYP1A mRNA nivåene fra leveren til torsk fra AL, AH, EL, EH og DH signifikant forskjellig fra nivåene i kontrollfisk, alle med $p < 0,0001$ (Dunnets). Medianverdiene for CYP1A mRNA nivåene fra leveren til torsk fra AL (94900; 33000-130700), AH (23700; 10800-36600), EL (21000; 18200-34300), EH (31100; 17400-55800) og DH (46500; 35700-54300) var mellom 39 (EL) og 179 (AL) ganger så høy som medianverdien til kontrollfisk (500; 100-1200). DL (800; 300-3300) var ikke forskjellig fra kontrollfisk.

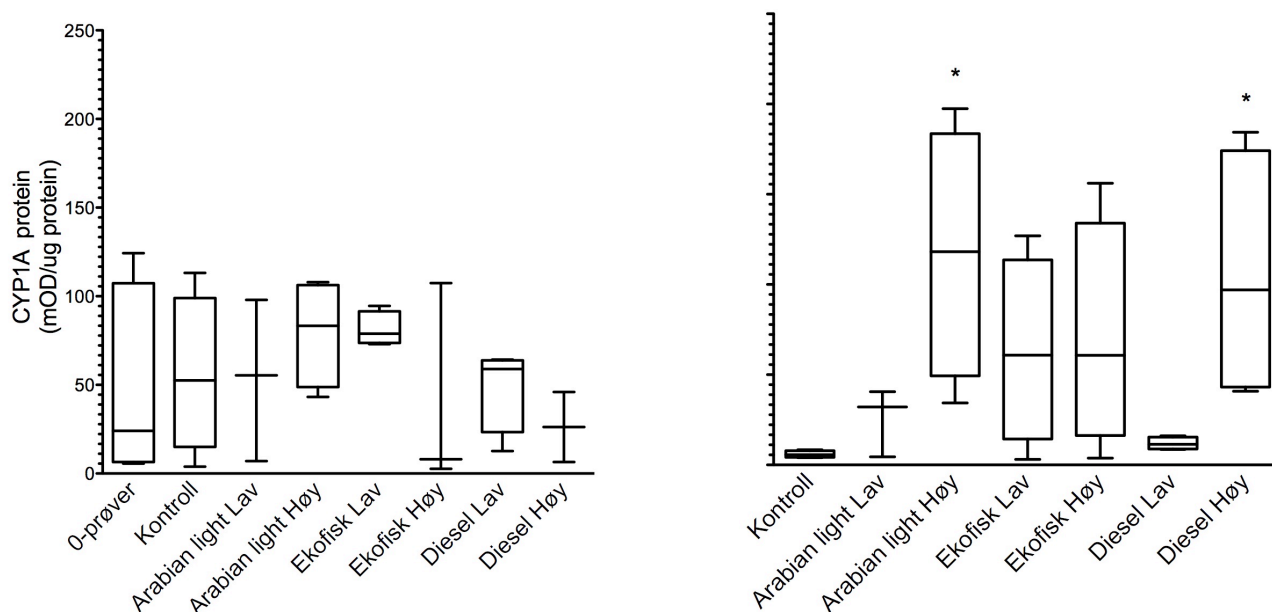


Figur 3.1 Mengde CYP1A mRNA (gjennomsnittlig normalisert ekspresjon) fra leveren til torsk ved forskjellige behandlinger etter en uke (venstre graf) og tre ukers (høyre graf) eksponering med median, kvartiler og 10 - 90 persentiler. * er signifikant forskjellig fra kontrollfiskene ($p \leq 0.05$). Y-aksen har \log_{10} skala.

3.4 CYP1A protein i lever (ELISA)

Det var ingen signifikant forskjell i CYP1A proteinnivåer fra leveren til "0"-prøvefisk og kontrollfisk etter en ukes eksponering. Det var ingen signifikant forskjell i CYP1A proteinnivåer fra leveren til fisken fra de forskjellige behandlingene (kontroll, Al, AH, EL, EH, DL, DH) (ANOVA, $p = 0,5$) (fig 3.2, venstre).

Det var ingen signifikant forskjell i CYP1A protein nivåer fra leveren til "0"-prøvefisk og kontrollfisk etter tre ukers eksponering. Det var signifikante forskjeller mellom CYP1A proteinnivåene fra leveren til fisken fra de forskjellige behandlingene (kontroll, Al, AH, EL, EH, DL, DH) (ANOVA, $p = 0,01$) (fig 3.2, høyre). Nivåene av CYP1A proteiner fra leveren til fisken fra AH (118,1; 49,4-183,6) og DH (97,0; 41,2-174,2) var signifikant forskjellige fra nivåene fra leveren til kontrollfisk (5,7; 4,3-7,9) med henholdsvis $p=0,006$ og $0,009$ (Dunnets). CYP1A proteinnivåene i leveren til fisk fra DL (11,4; 8,9-15,4) var ikke signifikant forskjellig nivået i kontrollfisk.

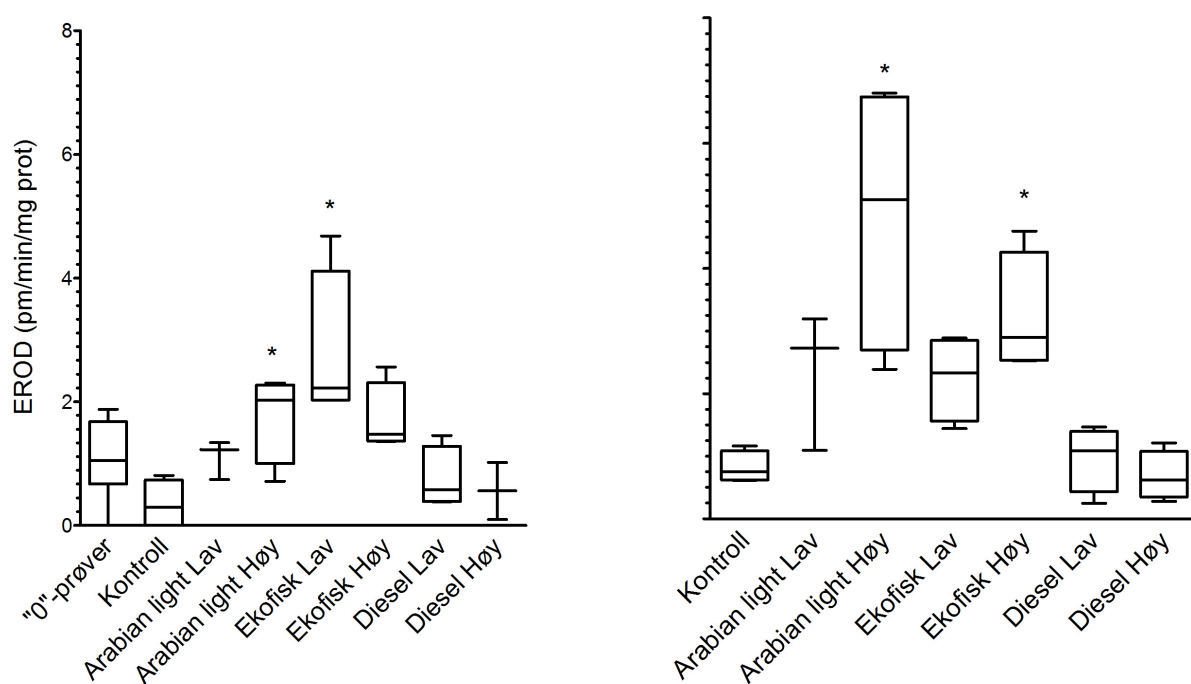


Figur 3.2 CYP1A proteiner (mOD/ug protein) i lever fra torsk ved forskjellige behandlinger etter en (venstre graf) og tre (høyre graf) ukers eksponering med median, kvartiler og 10 - 90 persentiler. * er signifikant forskjellig fra kontrollfisk ($p \leq 0,05$).

3.5 CYP1A aktivitet i lever (EROD)

CYP1A aktiviteten i leveren til "0"-prøvefisk var signifikant forskjellig fra aktiviteten i kontrollfisk etter en ukes eksponering ($p = 0,04$; t-test). Det var også signifikante forskjeller mellom CYP1A aktiviteten fra leveren til fisk fra de forskjellige behandlingene (kontroll, AL, AH, EL, EH, DL, DH) (ANOVA, $p = 0,003$) (fig 3.3 venstre). CYP1A aktiviteten i leveren til fisk fra behandlingene EL (2,22; 2,03-4,11) og AH (2,02; 1,00-2,27) var signifikant forskjellige fra aktiviteten kontrollfisk (0,29; -0,18-0,73) med henholdsvis $p = 0,0006$ og $p = 0,05$ (Dunnets).

Etter tre ukers eksponering var det ingen signifikant forskjell mellom CYP1A aktiviteten fra leveren til "0"-prøvefisk og kontrollfisk. Det var signifikante forskjeller mellom CYP1A aktiviteten fra leveren til fisk fra de forskjellige behandlingene (kontroll, AL, AH, EL, EH, DL, DH) (ANOVA, $p < 0,01$) (fig 3.3, høyre). CYP1A aktiviteten i leveren til fisk fra behandlingene AH (0,69; 0,42-0,83), EH (0,56; 0,40-0,62) og EL (0,36; 0,19-0,46) var signifikant forskjellige fra CYP1A aktiviteten i leverern til kontrollfisk (0,749; 0,622-1,086) med henholdsvis $p = 0,001$, $p = 0,002$ og $p = 0,05$ (Dunnets).

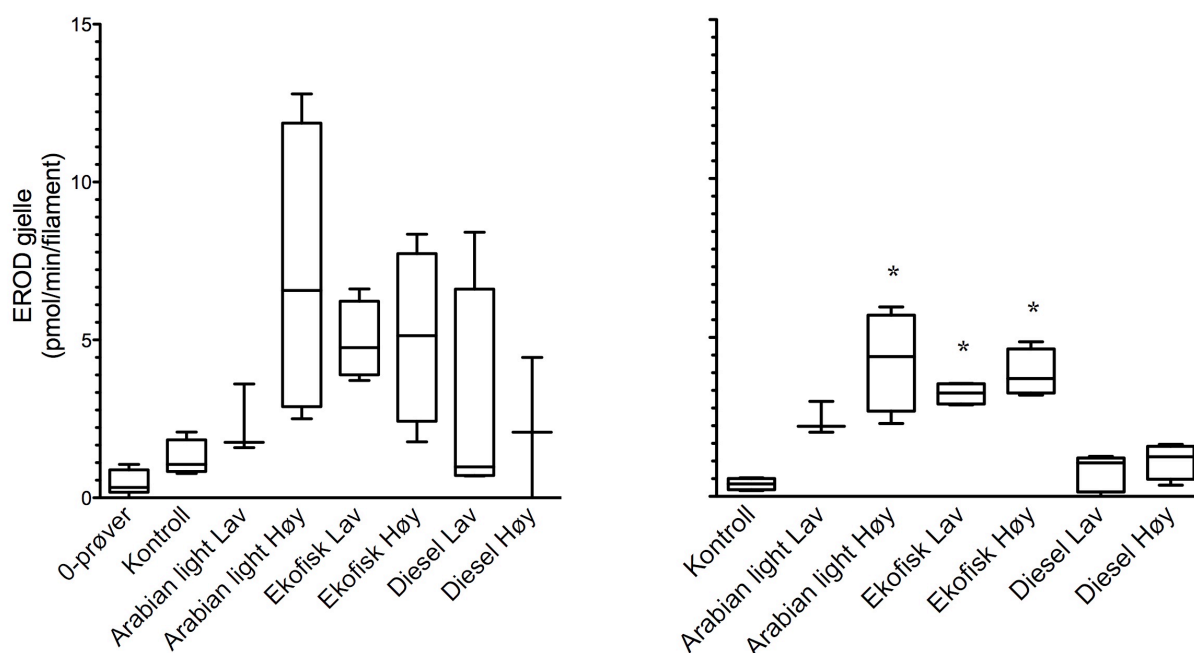


Figur 3.3 CYP1A aktiviteten (EROD pm/min/mg protein) i lever fra torsk ved forskjellige behandlinger etter en uke (venstre graf) og tre ukers (høyre graf) eksponering med median, kvartiler og 10 - 90 persentiler. * signifikant forskjellig fra kontroll ($p \leq 0,05$).

3.6 CYP1A aktivitet i gjeller (EROD)

Det var ingen signifikant forskjell mellom CYP1A aktiviteten i gjellene til "0" prøvefisk og kontrollfisk etter en uke. Det var heller ingen signifikant forskjell mellom CYP1A aktiviteten i gjellene til fisk fra de forskjellige behandlingene (kontroll, AL, AH, EL, EH, DL, DH) (χ^2 , $p = 0,1$) (fig 3.4, venstre).

Det var ingen signifikant forskjell mellom CYP1A aktiviteten i gjellene til "0" prøvefisk og kontrollfisk etter tre ukers eksponering. Det var signifikant forskjell mellom CYP1A aktiviteten i gjellene til fisk fra de forskjellige behandlingene (kontroll, AL, AH, EL, EH, DL, DH) (χ^2 $p = 0,002$) (fig 3.4, høyre). CYP1A aktiviteten i gjellene til fisk fra behandlingene AL (4,0; 2,7-5,2), EL (3,1; 2,7-2,9), EH (3,0; 2,6-3,8) var signifikant forskjellige fra CYP1A aktiviteten i gjellene til kontrollfisk (0,3; 0,1-0,4) med henholdsvis $p = 0,006$, $p = 0,01$ og $p = 0,03$ (Dunn).



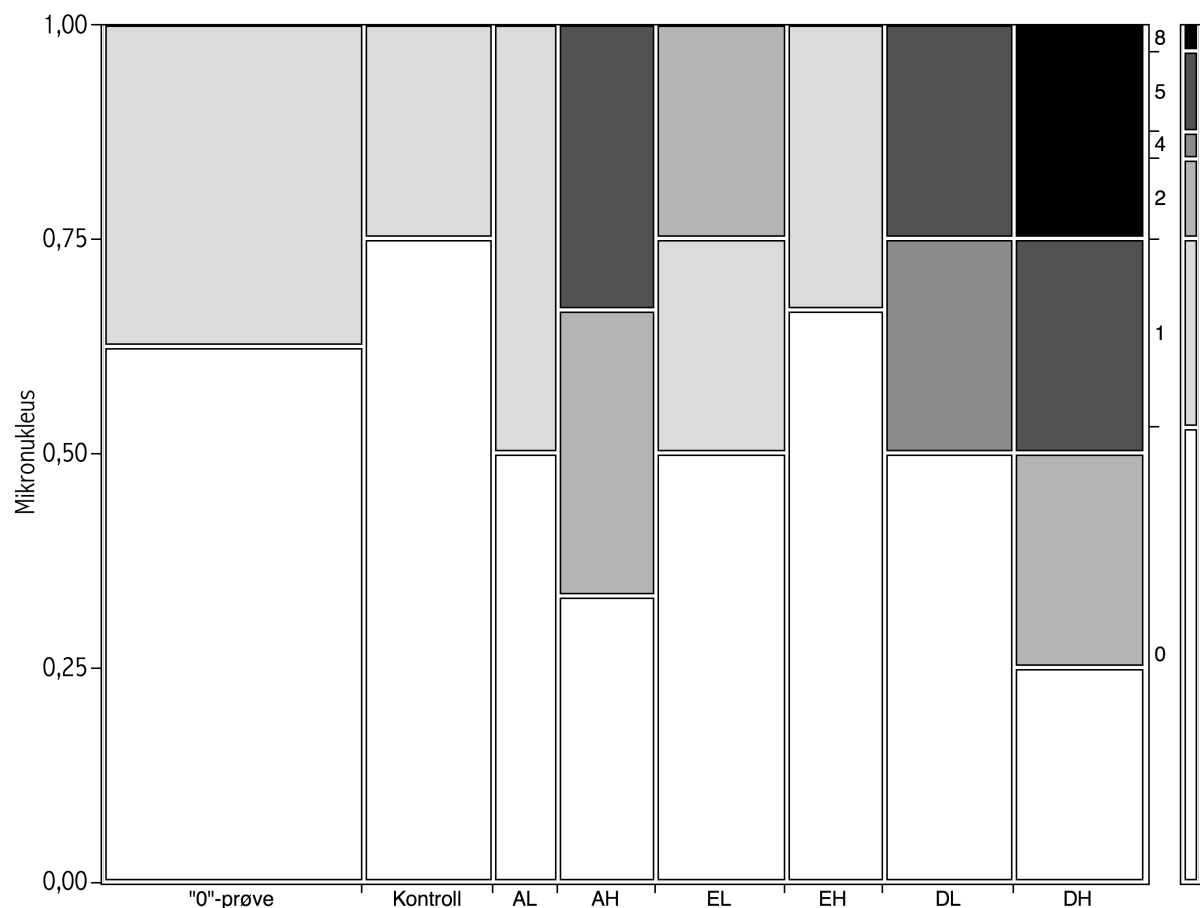
Figur 3.4 CYP1A aktivitet (EROD pmol/min/filament) i gjelle fra torsk ved forskjellige behandlinger etter en ukes (venstre figur) og tre ukers (høyre figur) eksponering med median, kvartiler og 10% - 90% persentiler. * er signifikant forskjellig fra kontroll ($p \leq 0.05$).

3.7 Mikronukleus i røde blodceller

I blodstryk fra "0"-prøvefisk var det 3 mikronukleus (MN) på 40364 telte celler (8 fisk) som gav en frekvens av mikronukleus på 0,07 (antall MN per 1000 celle) (fig 3.5).

Etter en ukes eksponering fantes i alt 18 MN fra samtlige blodstryk fra alle behandlingene. Av blodstrykene fra fisken etter en ukes eksponering var 8 identifiserbare og 17 uidentifiserbare (ukjente). 1 identifiserbart blodstryk fra kontrollfisken hadde 0 MN på 5031 telte celler. 2 identifiserbare blodstryk fra fisk fra behandlingen AL hadde 0 MN på 10044 telte. 2 identifiserbare blodstryk fra fisk fra behandlingen AH hadde 2 MN på 10046 telte celler og en frekvens på 0,19. 1 identifiserbart blodstryk fisk fra behandlingen EL hadde 0 MN på 5011 telte celler (1 fisk). 1 identifiserbart blodstryk fra fisk fra behandlingen EH hadde 2 MN på 5015 telte celler og en frekvens på 0,39. 1 identifiserbart blodstryk fra fisk fra behandlingen DL hadde 0 MN på 5014 telte celler. Ingen identifiserbare blodstryk fra fisk fra behandlingen DH. Blodstryk fra de uidentifiserbare prøvene hadde til sammen 14 MN formasjoner på 73911 telte celler og en MN-frekvens på 0,19.

Etter tre ukers eksponering hadde blodstryk fra kontrollfisken en MN frekvens på 0,05. Blodstryk fra fisk fra behandlingen DH hadde en MN frekvens på 0,74 som var ~15 ganger høyere enn kontrollfisken. Blodstryk fra fisk fra behandlingen AH hadde en MN-frekvensen på 0,46 som var ~9 ganger høyere enn kontrollfisken. Blodstryk fra fisk fra behandlingen DL hadde en MN frekvens på 0,45 og var 9 ganger høyere enn kontrollfisken. Blodstryk fra fisk fra behandlingene EL, AL og AH hadde MN frekvens på henholdsvis 0,15; 0,1; og 0,07 (fig 3.5), frekvenser nærliggende blodstryk fra kontrollfisken. Av samtlige blodstryk var 24 identifiserbare og 3 uidentifiserbare (henholdsvis "blodstryk nr. 1, 2 og 3"). De uidentifiserbare blodstrykene hadde 4 MN formasjoner på 8932 telte celler og en frekvens på 0,45. I to av de 3 ukjente ("blodstryk 1 og 2") hadde det oppstått celledød (apoptose) og hadde redusert antall mulige tellbare celler. I "blodstryk nr. 1" ble 2592 celler telt, hadde 2 MN formasjoner og en MN frekvensen på 0,77. I "blodstryk nr. 2" ble det telt 1317 celler med 0 MN formasjoner. I "blodstryk nr. 3" ble det telt 5023 celler og 2 MN gav en frekvens på 0,40.



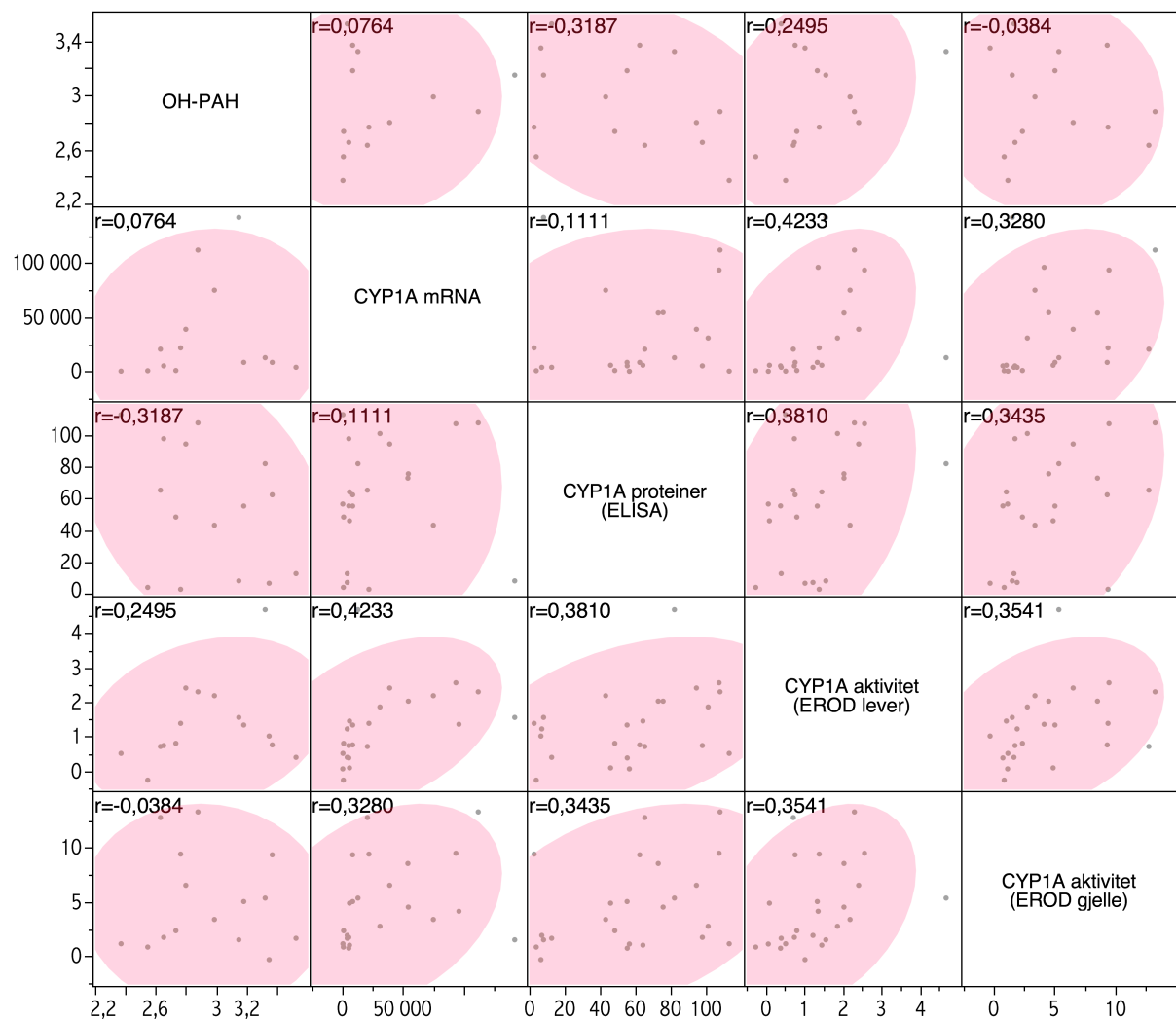
Figur 3.5 Mosaikk-plott med prosentandel og antall mikronukleus per behandling etter tre uker. Rektangelenes høyde (Y-akse) viser % andelen av de relative MN formasjoner. Rektangelenes bredde (X-akse) viser antall fisk per behandling. Gråskalasjattering viser antall MN (0, 1, 2, 4, 5 og 8). "0"-prøve = "0"-prøvefisk, Kontroll = kontrollfisk, AL = Arabian light Lav, AH = Arabian light Høy, EL = Ekofisk Lav, EH = Ekofisk Høy, DL = Diesel Lav, DH = Diesel Høy.

3.8 Sammenligning av responser

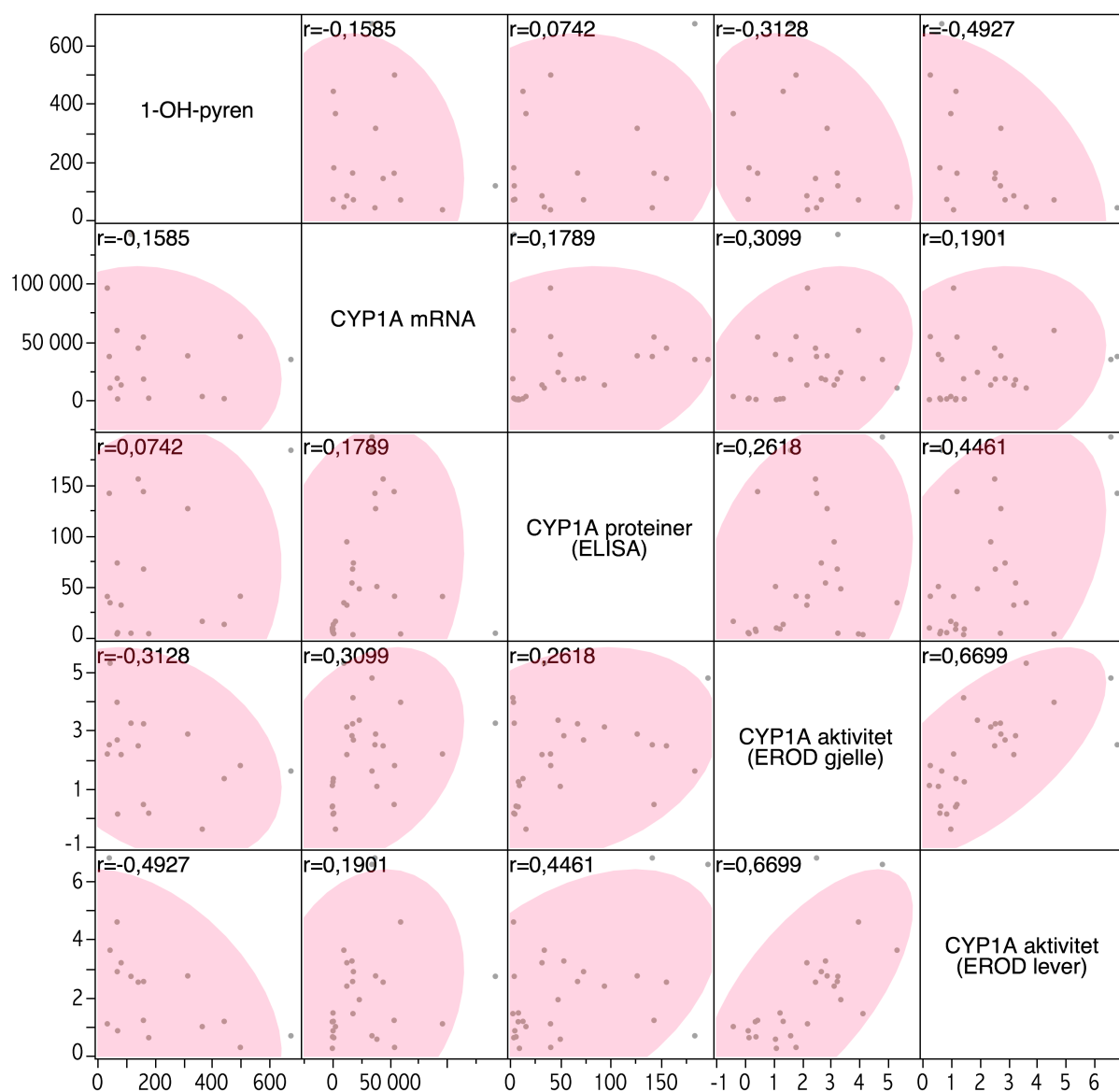
Det var signifikant positive korrelasjoner mellom pyrenkonsentrasjon i vann og summen av PAHer i vannet ($p < 0,0001$, Spearman), 1-OH-pyren og sum OH-PAH (Spearman, $p < 0,0001$), CYP1A mRNA og CYP1A aktivitet i lever (Spearman, $p < 0,0001$), CYP1A mRNA og CYP1A aktivitet i gjellene (Spearman, $p = 0,002$), CYP1A aktiviteten i lever og CYP1A aktivitet i gjelle (Spearman, $p = 0,007$), CYP1A mRNA og sum PAHer i vannet (Spearman, $p = 0,01$) og mellom CYP1A mRNA og pyrenkonsentrasjonene i vannet (Spearman, $p = 0,03$) etter en uke (fig 3.6).

Det var signifikant positive korrelasjoner mellom CYP1A aktiviteten i lever og gjelle (Spearman, $p < 0,0001$), CYP1A mRNA og sum PAHer i vannet (Spearman, $p = 0,0007$), 1-OH-pyren og sum PAHer i vannet (Spearman, $p = 0,0009$), pyrenkonsentrasjoner i vannet og sum PAHer i vannet ($p = 0,002$, Spearman), CYP1A mRNA og CYP1A aktivitet i gjellene (Spearman, $p = 0,02$),

CYP1A aktiviteten i gjellene og sum PAHer i vannet (Spearman, $p = 0,04$) og mellom CYP1A proteiner i leveren og CYP1A mRNA (Spearman, $p = 0,05$). Det var signifikant negativ korrelasjon mellom 1-OH-pyren og CYP1A aktiviteten i lever (Spearman, $p = 0,006$) etter tre uker (fig 3.7).



Figur 3.6 Scatterplot av pyren gallemetabolitter OH-pyren, CYP1A mRNA, mengde CYP1A proteiner (ELISA), CYP1A aktivitet i lever (EROD lever) og CYP1A aktivitet i gjelle (EROD gjelle) etter en ukes eksponering. "r" er korrelasjonen mellom variablene. Skyggelagt tetthetsellipse ($\alpha = 0,05$) indikerer retning av korrelasjon.



Figur 3.7 Scatterplot av pyren gallemetabolitter 1-OH-pyren, CYP1A mRNA, mengde CYP1A proteiner (ELISA), CYP1A aktivitet i lever (EROD lever) og CYP1A aktivitet i gjelle (EROD gjelle) etter tre ukers eksponering. "r" er korrelasjonen mellom variablene. Skyggelagt tetthetsellipse ($\alpha = 0,05$) indikerer retning av korrelasjon.

4 Diskusjon

4.1 Eksponering

Etter en uke var det høyere nivåer av den totale konsentrasjonen av PAHer (Σ PAH + Σ alkylerte PAH) i vannet fra de olje- og dieseleksponerte behandlingene i forhold til vannet fra kontrollen og klare separasjoner mellom lav- og høydosene fisken var eksponert for. Den totale konsentrasjonen av PAHer i vannet fra lavdosene var mellom 6 til 10 ganger høyere enn vannet fra kontrollen og vannet fra høydosene mellom 30 til 60 ganger høyere enn vannet fra kontrollen. Det var en overvekt av de lavmolekylære PAHene i vannet (2- og 3-ringede PAHer) (Atlas *et al.*, 1981; Lee og Anderson, 2005; Ramachandran *et al.*, 2006), som metylnaftalenene og metylfenantrenene, og betraktelig lavere relative bidrag fra de større PAHene, som for eksempel fluoren og pyren. Etter tre uker var det en nedgang i den totale konsentrasjonen av PAHer og endringer i de relative bidragene av PAH komponentene. Overvekten av de lavmolekylære PAHene, den generelle nedgangen etter tre uker, de få stigningene og noe av endringene i de relative bidragene av PAH komponentene, kan blant annet komme av designet på gjennomstrømningssystemet. Vannet som kontinuerlig ble pumpet gjennom kolonnene med oljeholdig grus kan ha vasket de lavmolekylære og de mer vannløselige PAHer ut av grusen først (Carls *et al.*, 1999; Sturve *et al.*, 2006). De større PAHene (mer enn 3 ringer) er mindre vannløselige og har en tendens til å være tettere bundet til partikler eller organisk materiale og kan ha blitt vasket noe saktere ut av grusen enn de lettere PAHene (Martinez-Gomez *et al.*, 2010).

Vanndataene fra dette eksperimentet ligner de observert av Carls *et al.* (1999) hvor de etterlignet oljeutslippet fra Exxon Valdez i Princ Williams Sound i et gjennomstrømningssystem. De pumpet vann gjennom kolonner med 4 forskjellige konsentrasjoner av forvitret oljeholdig grus og eksponerte egg fra sild i 16 dager. De totale PAH nivåer i vannet fra eksperimentet fordelte seg i et konsentrasjonsavhengig mønster og avtok gradvis mot slutten eksperimentet. Videre observerte de en overvekt av de mindre PAHene ved starten av eksperimentet med en forskyvning mot de større PAHene mot slutten av eksperimentet, ettersom de mer vannløselige PAHene ble raskere vasket ut av grusen. Nahrgang *et al.*, (2010a) gjennomførte et lignende studie med polartorsk eksponert for råolje i fire uker. De totale PAH nivåene fra vannet fordelte seg i et konsentrasjonsavhengig mønster ved starten av eksperimentet, med overvekt av de mindre PAHene som avtok gradvis mot slutten av eksperimentet. De mindre PAHene ble raskere vasket ut av grusen enn de større mer persistente PAHene. Aas *et al.*, (2000) eksponerte torsk for tre vedvarende stabile konsentrasjoner råolje i 30 dager i et gjennomstrømningssystem og observerte konsentrasjonsavhengige fordelinger av de totale PAH nivåene med overvekt av de mindre PAHene. Resultatene til Carls *et al.*, (1999), Nahrgang *et al.*, (2010a) og Aas *et al.*, (2000) lignet resultatene fra denne oppgaven.

Short og Harris (1996) observerte PAH konsentrasjoner i vannet nær overflaten (1 m og 5 m dybde) 14 dager etter Exxon Valdez oljeutslippet lå mellom 1,3 og 6,2 µg/L. Neff og Stubblefield (1995) dokumenterte at av 2461 vannprøver (1 m og 3 m dybde) var den totale konsentrasjoner av PAHer mindre enn 10 µg/L. Konsentrasjonen av hydrokarboner nær oljeplattformer i Nordsjøen er vist å ligge mellom 1 og 5 µg/L (Stagg *et al.*, 1995; Stagg og McIntosh, 1996). Flere studier av effekter av olje på CYP1A enzymesystemet har benyttet relativt høye PAH konsentrasjoner (opptil 300 µg/L) (Payne og Fancey, 1982; Goksøyr *et al.*, 1991; Kennedy og Farrell, 2005; Nahrgang *et al.*, 2010a). Den totale konsentrasjonen av PAHer i vannet fra denne oppgaven var, fra laveste til høyeste dose, ~1 µg/L (AL) til ~6,3 µg/L (DH) og indikerer at fisken har vært eksponert for økologisk relevante konsentrasjoner.

4.2 Metabolitter

”0”-prøvefisken hadde lave nivåer av metabolitter i gallen og var på nivåer nærliggende kontrollfisken etter både en og tre uker. Disse nivåene representerer et bakgrunnsnivå av metabolismen i fisken. Metabolitten 1-OH-pyren er tidvis benyttet som markør for den totale PAH- metabolismen (Ariese *et al.*, 1993; Budzinski *et al.*, 2004) og 1-OH-pyren var positivt korrelert med sum OH-PAHene og indikerer at 1-OH-pyren er egnet til bruk som markør for total PAH-eksponering. Pyrenmetabolittene hadde klare konsentrasjonsavhengige separasjoner mellom kontroll, lav- og høydoseringene etter 1 ukes eksponering og indikerer doseavhengig eksponering for PAHer. De gjennomsnittlige nivåene av pyrenmetabolittene i torsken etter 1 ukes eksponering var på nivå med økologisk relevante nivåer observert fra skrubbe (*Platichthys flesus*) (Eggens *et al.*, 1996; Kammann, 2007), sandflyndre (*Limanda limanda*) (Kammann, 2007), hyse (*Melanogrammus aeglefinus*) og torsk fra Nordsjøen (Hylland *et al.*, 2006; Aas *et al.*, 2006).

De større og mer persistente PAH komponentene som benzo(a)pyren (B(a)P) hadde ikke-detektebare konsentrasjoner i vannprøvene, men viste seg i en konsentrasjonsavhengig fordeling i metabolittene. Dette indikerer at det relative bidraget til de forskjellige PAHene, kjent fra vannprøvene, kan ha vært unøyaktig. Slik unøyaktighet kan komme av at konsentrasjonen av PAH metabolitter i gallen er avhengig av den biotilgjengelige andelen av PAHene (Meador *et al.*, 2008). Dette kan ha innvirket på den mangelen på korrelasjon mellom PAH konsentrasjonene i vannet og konsentrasjonen av metabolitter i gallen. Noe av variasjonen i PAH metabolittene mellom behandlingene og fra en til tre uker, kan også komme av individuelle variasjoner i fisken (Collier og Varanasi, 1991). Gallen skilles også ut ved fordøyelse, og mengden gallemetabolitter vil følgelig være avhengig av tiden fra siste foring (Collier and Varanasi, 1991). Fisken i denne

oppgaven ble foret 3-5 dager før prøvetagningen for å forhindre galleblæren å være tom under prøvetagning. Det var fremdeles noe variasjon på mengde galle fra de forskjellige fiskene under prøvetagningen og kan ha innvirket på den detekterte metabolismen. Oppgangen av 2-OH-Bi, 1-OH-krysen og OH-B(a)P fra en til tre uker kan komme av enterohepatisk resirkulasjon av metabolittene. Det har vist seg vanskelig å oppdrive studier som dokumenterer disse mekanismene i fisk, men flere studier har dokumentert resirkulering av xenobiotiske stoffer i pattedyr (Viau *et al.*, 1999). Resultatene fra denne oppgaven indikerer at kvantifisering av PAH metabolitter fra gallen til fisk er en sensitiv metode for deteksjon av relativt lave nivåer av PAH eksponering (Holth *et al.*, 2009).

4.3 CYP1A mRNA fra lever i torsk

Etter en ukes eksponering var det ingen forskjell i CYP1A mRNA nivåer fra leveren til "0"-prøvefisk og kontrollgruppe. Det var uventet stor variasjon i "0"-prøvefisk med en forskjell på 1:560 fra laveste til høyeste målte mRNA nivå til tross for eliminering av potensielle faktorer som er kjent for å øke variasjon som kjønn, utviklingsstadium og reproduktiv status. Noe av variasjonen CYP1A mRNA nivåene kan skyldes individuelle variasjoner i de biokjemiske signalveiene som leder frem til transkripsjonen av CYP1A gener i fisken (Roy *et al.*, 1996; Wirgin *et al.*, 1996).

Det var signifikant oppregulerte CYP1A mRNA nivåer i leveren fra torsk fra samtlige behandlinger sammenlignet med kontrollfisk og indikerer respons på eksponeringen etter en uke. Dette ble underbygget av en signifikant korrelasjon mellom CYP1A mRNA nivåene og konsentrasjonene av PAH-er fra vannprøvene (sum PAH og pyren). CYP1A mRNA nivåene fra leveren i torken fordelte seg med klare separasjoner mellom høy- og lavdoseringene og gjenspeilet de relative PAH nivåene i vannet. Oppregulerte nivåer av CYP1A mRNA etter PAH eksponering er kjent i andre studier og indikerer økt cellulær metabolisme i fisken (George *et al.*, 1995; Stagg *et al.*, 2000; Nahrgang *et al.*, 2010c). Det var positive signifikante korrelasjoner mellom CYP1A mRNA i leveren og EROD aktiviteten i gjelle etter 1 uke og indikerer at eksponeringen gav respons i flere organer samtidig og i flere cellulære nivåer av CYP1A systemet (Goksøyr og Forlin, 1992; Whyte *et al.*, 2000).

Etter tre uker var det signifikant høyere CYP1A mRNA nivåer i leveren til torsk fra alle behandlinger sammenlignet med kontrollgruppen, foruten fisk fra DL. I studier av Haasch *et al.*, (1992) hvor regnbueørret ble eksponert i et gjennomstrømningssystem for β -naftalen (0,625-500 $\mu\text{g/L}$), ble det observert signifikant økning i CYP1A mRNA nivåer i forhold til kontrollfisk og vedvarende induksjon i opptil syv dager etter eksponering. I studiene til Nahrgang *et al.* (2010a)

hvor polar torsk var eksponert i fire uker for WAF av råolje faller CYP1A mRNA nivåene tilbake til bakgrunnsnivået etter fisken ble oppholdt to uker i rent vann. I andre studier er det kjent at mRNA har generelt kort levetid og at mesteparten av eukaryot mRNA degraderes kun få timer etter transkripsjonen (Fan *et al.*, 2002). Den vedvarende ekspresjonen av CYP1A mRNA, til tross for lave verdier av PAH-er konsentrasjoner i vann- og galleprøver på samme tidspunkt, kan komme av forsinket justering av de pre- og/eller posttranskripsjonelle mekanismene samt høy stabilitet av mRNA molekylene i fisken.

I leveren til fisk eksponert for diesel lavdosen var CYP1A mRNA nivåene nærliggende nivået observert i kontrollfisken. Det kan være mulig at dieselen ble vasket raskere ut av denne kolonnen enn oljene og dieselen ble fra de andre kolonnene. Vinduet mellom prøvetakningene er derimot så stort at tidspunktet for den aktuelle nedgangen ikke lar seg bestemme presist. En annen årsak kan være knyttet til de lave B(a)P nivåene i vannet fra DL. B(a)P er en kjent AhR agonist og vist å inducere CYP1A i fisk (for eksempel Wirgin *et al.*, 1996; Barron *et al.*, 2004). Det kan være at den lave konsentrasjon av B(a)P i vannet fra DL kan ha bidratt til de lavere CYP1A mRNA nivåer i denne behandlingen.

4.4 CYP1A protein i lever hos torsk (ELISA)

I syntesen av CYP1A protein oversettes nukleotidsekvensene av CYP1A mRNA molekyler til aminosyresekvenser i CYP1A proteiner (Klopppersams og Stegeman, 1989; Andersson og Förlin, 1992; Pesonen *et al.*, 1992). I analysene av CYP1A proteiner i leveren til torsken hadde både kontrollfisken og "0"-prøvefisken relativt store variasjoner etter 1 uke og var følgelig ikke signifikant forskjellige. Det var heller ingen signifikante forskjeller av CYP1A proteiner i leveren til torsken etter en ukes eksponering mellom de forskjellige behandlingene. I et studie av Husøy *et al.* (1996) på torsk og flyndre oppholdt i bur i Sørfjorden i Norge var det indikasjoner på at spesifikke målceller i spesifikke organer, gav mer sensitive mål på CYP1A induksjon enn de mer generelle organnivå analysene ved analyser med ELISA metoden. Det var ikke tatt hensyn til spesifikke målceller i denne oppgaven og dette kan ha innvirket på sensitiviteten til ELISA.

Etter tre ukers eksponering var det ingen signifikant forskjell mellom "0"-prøvefisken og kontrollfisken. Kontrollfisken hadde derimot mindre variasjon av CYP1A proteiner i forhold til kontrollfisken etter en uke. Videre var det signifikante forskjeller mellom Arabian light høydose og diesel høydose mot kontrollgruppen samt en tendens til en konsentrasjonsavhengig fordeling av CYP1A proteinnivåer i Arabian light og diesel behandlingene. En slik induksjon av CYP1A proteiner i levervevet til torsken stemmer overens med den detoksifiserende rollen dette organet

har og indikerer respons på eksponeringen. CYP1A proteinnivåene indikerer også en forsinket respons på de oppregulerte mRNA nivåene og kan ha en sammenheng med posttranskripsjonelle mekanismer og protein syntese *de novo*. Lignende studier viser derimot langt raskere CYP1A proteinsyntese og påfølgende effekter (proteinaktivitet målt som EROD) enn de observerte etter tre uker i denne oppgaven (Kloepersams og Stegeman, 1989; Aas *et al.*, 2000; Gagnon og Holdway, 2000; Nahrgang *et al.*, 2010a). Videre var CYP1A proteinnivåene i DL etter tre uker nærliggende nivået fra kontrollfisk og indikerer en direkte sammenheng med de lave nivåene av CYP1A mRNA i diesel lav etter tre uker.

Utover dette var det en tendens til korrelasjon mellom CYP1A proteiner i leveren og EROD aktiviteten i leveren etter tre uker med en $p = 0,053$. Studier av CYP1A genuttrykk og andre CYP1A biomarkører har økt de siste 20 årene (Nahrgang *et al.*, 2010a). Til tross for dette er det ennå ikke påvist en klar sammenheng mellom responsen i genuttrykk og enzym (George *et al.*, 2004; Tom og Auslander, 2005) og den manglende korrelasjonen mellom mRNA og proteiner (Tom *et al.*, 2003; George *et al.*, 2004) i leveren til fisken kan komme av komplekse forhold i induksjons-, transkripsjonelle- og posttranskripsjonelle mekanismer.

4.5 CYP1A aktivitet i lever (EROD)

Det var signifikant forskjell i CYP1A enzymaktivitet i leveren mellom ”0”-prøvefisk og kontrollfisk etter en uke, men ingen signifikant forskjell etter 3 uker. Nivåene i kontrollfisk representerer bakgrunnsnivået av CYP1A aktiviteten, målt som EROD aktivitet, i leveren til torsken. Det var signifikant høyere EROD aktiviteter i leveren til fisk fra behandlingene AH og EL i forhold til kontrollfisk og indikerte respons på eksponeringen etter en uke. Resultatene fra målingene av CYP1A mRNA viste en relativt rask respons på eksponeringen med signifikant oppregulerte mRNA nivåer i samtlige behandlinger og indikerer en noe forsinket respons i CYP1A aktivitet i leveren til torsken. Lignende forsinkelser av EROD aktivitet er kjent fra studier av polartorsk eksponert for råolje (Nahrgang *et al.*, 2010a). De observerte en relativt rask økning av CYP1A mRNA fra leveren på fisken, men en noe forsinket økning i EROD aktivitet i leveren til fisken. Noe av forsinkelsene var antatt å komme av posttranskripsjonelle mekanismer og proteinsyntese etter induksjon. I studiene til Aas *et al.* (2000) ble det observert en rask økning i EROD aktivitet i leveren til fisken eksponert for høydosen (1ppm råolje), mens fisk fra de lave doseringene (0,06 og 0,25 ppm) ikke hadde signifikant forskjell i EROD aktivitet før etter 16 og 30 dager. Den laveste doseringen (0,06 ppm) fra studiene til Aas *et al.* (2000) er på nivå med høyeste dosering i denne oppgaven og underbygger indikasjonene om en noe forsinket EROD aktivitet.

Videre var det etter en ukes eksponering signifikant positiv korrelasjon mellom de relativt hurtig oppregulerte CYP1A mRNA og EROD aktiviteten i leveren, også kjent fra andre studier (Kloepersams og Stegeman, 1989; Andersson og Förlin, 1992; Nahrgang *et al.*, 2010a). Funnene underbygger sammenhengen mellom eksponeringen, de oppregulerte CYP1A mRNA nivåene med påfølgende økt enzymaktivitet. Det var også signifikant korrelasjon mellom EROD aktivitet i leveren og EROD aktiviteten i gjellene som som indikerer samstemte responser i to separate organer på eksponeringen.

Etter tre uker var det konsentrasjonsavhengig fordeling i Arabian light og Ekofisk behandlingene med signifikante forskjeller i EROD aktivitet i leveren til fisk fra AH, EL og EH i forhold til nivåene i kontrollfisk. Dette indikerer en vedvarende CYP1A aktivitet i leveren fra torsken til tross for nedgangen av PAH konsentrasjonene i vannet på samme tidspunkt. Dette viste seg igjen i en negativ korrelasjon mellom EROD aktiviteten i leveren til torsken med 1-OH-pyren fra gallen. Studiene til Aas *et al.* (2000) og Nahrgang *et al.* (2010c) hadde lignende konsentrasjonsavhengig og vedvarende høye EROD aktiviteter til tross for lave nivåer av PAH konsentrasjoner i vannet til fisken. Studier av (Gagnon og Holdway, 2000; Nahrgang *et al.*, 2010b) observerte også vedvarende høye EROD aktiviteter til tross for lave nivåer av PAH konsentrasjoner i vannet til fisken. Denne vedvarende EROD aktiviteten kan komme av den vedvarende høye transkripsjonen av CYP1A mRNA, men også av enzymatiske egenskapene som proteininstabilitet og lave degraderingsrater (Correia, 1991; Roberts, 1997; Pörtner *et al.*, 2005).

Økt EROD aktivitet i leveren til fisk eksponert for PAH er kjent fra flere studier. Studier av Goksøyr *et al.* (1994a) rapporterte en doseavhengig respons på hepatisk EROD aktivitet i området 50-150 pmol min⁻¹ mg⁻¹ protein for juvenile torsk oppholdt i bur i en forurenset fjord. Sturve *et al.* (2006) eksponerte juvenil oppdrettstorsk i et gjennomstrømningssystem for økologisk relevante doser (0,5 ppm) råolje fra nordsjøen og observerte signifikant økt EROD aktivitet fra leveren til torsken etter 15 dager til forskjell fra kontrollfisk. EROD aktiviteten økte også i leveren hos juvenil torsk eksponert råolje (15 – 130 µg/L) i 7 uker i et gjennomstrømningssystem (Goksøyr *et al.*, 1991). Studier av polar torsk injisert med råolje har også observert kraftig induert EROD aktivitet fra leveren (George *et al.*, 1995). Whyte *et al.* (2000) viser til 25 studier av 15 forskjellige arter fisk eksponert for PAH B(a)P med induerte hepatisk EROD aktivitet. Fra studiene over er det observer relativ raske induksjoner av EROD aktivitet. Munkittrick *et al.* (1995) eksponerte regnbueørret for PAH kontaminerte sedimenter i 28 dager og observerte induksjon av EROD aktivitet i 14 dager før en nedgang til kontrollnivåene etter 21 og 28 dager. Munkittrick *et al.* (1995) foreslo at induksjonen av EROD aktiviteten toppes tidlig i eksponeringsfasen og når CYP1A enzymer starter metabolismen vil enzymaktiviteten synke til et stabiliserende nivå. Videre

vil toppen av EROD aktivitet varierer mellom studier som følge av bruk av forskjellige typer råolje, konsentrasjonen av oljene, temperaturer og salinitet i vannet til forskjellige arter og interindividuelle variasjoner i fiskene. I denne oppgaven var det lavere nivåer av EROD aktivitet i leveren til torsken sammenlignet med studier over og samstemmer med tilsvarende lavere eksponeringsnivåer i vannet til fisken.

Målingene av CYP1A proteiner og EROD aktiviteten fra leveren til torsken, indikerer effekt i både proteinprodukt og påfølgende EROD aktivitet etter en og tre ukers eksponering. Begge metodene er relativt destruktive og mindre sensitive på cellulære nivåer og katalytisk aktivitet kan reduseres gjennom uforsiktig behandling av prøvene og ved tilstedeværelse av potensielle hemmere (Goksøyr *et al.*, 1994b; Beyer *et al.*, 1996; Husøy *et al.*, 1996; Viarengo *et al.*, 1997; Risso-de Faverney *et al.*, 1999).

CYP1A aktivitetene fra leveren til fisk fra diesel behandlingen var lave, på nivå med kontrollfisken, og skilte seg tydelig fra de to oljebehandlingene. I tilfeller hvor det er mistanke om hemming av EROD aktivitet, kan mRNA nivåer benyttes for å bedre bestemme en direkte sammenheng mellom eksponering og effekt (Whyte *et al.*, 2000). CYP1A mRNA og proteinanalysene i torsken fra DL behandlingen var ikke signifikant forskjellig fra kontrollen og dette kan forklare det lave nivået i EROD aktiviteten i DL. I DH var det derimot signifikant høyere nivåer av både CYP1A mRNA og CYP1A proteiner i forhold til kontrollen. Den påfølgende lave EROD aktivitet i fisk fra DH er på nivå med EROD aktiviteten fra kontrollfisken og indikerer å være hemmet. Fra analysene av vannprøvene ble det detekterte høye nivåer av lavmolekylære PAHer i vannet fra diesel behandlingene. Det er kjent fra studier av McKee *et al.* (1983) og Willett *et al.* (2001) at lavmolekylære PAHer (<5 ringer) ikke spesielt potente i CYP1A induksjon og kan til og med hemme CYP1A aktivitet. Utover dette finnes studier der det er observert fravær av økt EROD aktivitet etter dielekspose. Skrubbe (*Platichthys flesus*) eksponert for flere konsentrasjoner av diesel i 120 dager hadde ingen signifikant økt EROD aktivitet fra kontrollfisken (Addison og Edwards, 1988; Stegeman *et al.*, 1988). De lavmolekylære 2- og 3 ringede PAHer funnet i dieselene gav ingen CYP1A induksjon. Det kan dermed være induksjon av EROD aktiviteter etter eksponering for råoljer, men siden majoriteten av PAHene fra oljeutslipp er 2- og 3 ringede PAHer finnes det også tilfeller med fravær av EROD aktivitet (Goksøyr *et al.*, 1991; Holth *et al.*, 2009).

4.6 CYP1A aktivitet i gjellene (EROD)

Det var ingen signifikant forskjell mellom "0"-prøvefisk og kontrollfisk etter en og tre ukers eksponering. Dette viser at de målte EROD aktivitetene i kontrollfisk representerer et bakgrunnsnivå i begge prøvetakningene. Etter en uke var ingen av behandlingene signifikant forskjellige fra kontrollen, men det var en tendens til høyere aktivitet i gjellene i AH, EL og EH. Etter en uke var EROD aktiviteten i gjellene positivt korrelert med EROD aktiviteten i leveren og CYP1A mRNA fra leveren. Disse korrelasjonene indikerer effekter av eksponering i flere organer i samme tidsrom. Studier av Nahrgang *et al.* (2010c) observerte induert EROD aktivitet i leveren og i gjellene til polar torsk eksponert for den vannløslig fraksjon av råolje. Det var også induert EROD aktiviteten i gjellene til fisken eksponert for råolje via dietten og indikerer transport av PAH-er via sirkulasjonssystemet i fisken (Nahrgang *et al.*, 2010c). Korrelasjonene i denne oppgaven kan være forsterket av slik transport av PAH-er i fisken.

Etter tre uker var det en konsentrasjonsavhengig fordeling av EROD aktivitet i Arabian light og Ekofisk behandlingene med signifikante forskjeller fra kontrollen i AL, EL og EH. Abrahamson *et al.* (2008) observerte lignende konsentrasjonsavhengig induert EROD aktivitet i gjellene til torsk eksponert for råolje fra Nordsjøen statistisk i 24 timer (1 og 10 ppm) og for økologisk relevante konsentrasjoner (fortynnet PW 1:200 og 1:1000 samt 0,2 ppm råolje fra Nordsjøen) i 14 dager i et gjennomstrømningssystem. I studiet av Nahrgang *et al.* (2010c) var det også observert vedvarende induert EROD aktiviteten i gjellene ved lave PAH konsentrasjoner i vannet. Den vedvarende EROD aktiviteten kan komme av enzymatiske egenskaper som protein stabilitet og lave degraderingsrater av CYP1A mRNA diskutert under EROD aktiviteten i leveren.

Videre korrelerte EROD aktiviteten med EROD aktiviteten i leveren, med CYP1A mRNA nivåene fra leveren og med sum PAH-ene i vannet. Disse korrelasjonene indikerer sammenheng mellom eksponering og effekter av eksponeringen i flere organer og på flere nivåer av cellulær organisering i torsken i samme tidsrom.

Etter tre uker var det noe lavere variasjonen i EROD aktivitet fra samtlige behandlinger enn etter en ukes eksponering. Dette indikerer en mer stabil EROD aktivitet og at toppen av EROD aktivitet var nådd i samtlige individer, som diskutert under EROD aktiviteten i leveren. Dette kan indikere at det kan være et tidspørsmål før variasjonen i EROD aktiviteten observert fra leveren også vil stabilisere seg og faller tilbake til et nivå nærmere kontrollnivåene.

Jönsson (2003) studerte EROD aktivitet i gjellene til 5 forskjellige arter fisk, inkludert torsk, eksponert for dioxin lignende stoffer og observerte lignende signifikant induert EROD aktivitet i forhold til kontrollfisk med nivåer på mellom $\sim 0,01$ - $0,075$ pmol resorufin filament⁻¹ min⁻¹.

EROD aktiviteter er også observert i gjeller hos regnbueørret oppholdt i bur i en forurenset fjord fra Sverige med $\sim 0,03\text{--}0,14$ pmol resorufin filament⁻¹ min⁻¹ Abrahamson *et al.* (2007). Disse studiene har betraktelig lavere EROD aktivitet enn denne masteroppgaven hvor det er observert en gjennomsnittlig EROD aktivitet i "0"-prøvefisk på 3,5 pmol resorufin filament⁻¹ min⁻¹, et gjennomsnitt på 6,5 pmol resorufin filament⁻¹ min⁻¹ i kontrollfisk og mellom 0,5-13 pmol resorufin filament⁻¹ min⁻¹ i de forskjellige behandlingene. Denne forskjellen kan komme av forskjell i størrelsen og antall filamentene mellom studiene.

Etter tre uker hadde dieselbehandlingen ingen induisert EROD aktivitet og var på nivå med kontrollgruppen. Dieselbehandlingen skiller seg dermed tydelig fra de to oljebehandlingene og har et lignende mønster som EROD aktivitet fra leveren til torsken. Dette underbygger indikasjonene på hemming av og/eller overvekten av de lavmolekylære 2- og 3 ringede PAHer funnet i dieselen, som diskutert tidligere under EROD aktiviteten i leveren.

Videre indikerer de generelt lave EROD aktivitetene fra kontrollfisk, registrert fra både gjelle og lever prøvene, at sjøvannet hentet inn utenfor forskningsstasjonen i stor grad var fri for kontaminasjon av EROD induserende substanser.

4.7 Mikronukleus dannelse i røde blodceller

"0"-prøvene bestod av 8 fisk (8 replikater) og hadde til sammen 3 MN formasjoner og en frekvens på 0,07. Røde blodceller fra "0"-prøvefisk og fra kontrollfisk etter tre uker, hadde en nærliggende frekvens av MN formasjoner og representerte bakgrunnsnivået av MN formasjoner i torsken. Det sammenlignes ikke med kontrollfisk etter en ukes eksponering som kun besto av en identifiserbar prøve.

Etter en ukes eksponering hadde de identifiserbare prøvene fra AL, AH, EL, EH og DL (ingen identifiserbare i DH) varierende MN frekvenser og gav ingen entydig indikasjon på MN formasjon som en følge av eksponeringen. På grunn av mange uidentifiserbare (ukjente) prøver, ble det valgt å se på frekvensen av MN formasjoner i alle de ukjente prøvene sammenlagt. Dette ga en frekvens på 0,19 som er noe høyere enn frekvensen til "0"-prøvefisk og kontrollfisk etter tre ukers eksponering. I tillegg til dette tilhører 3 av prøvene blandt de 17 ukjente blodstryk fra kontrollfisk. Dette indikerer en potensielt underestimert MN frekvens i de ukjente prøvene.

Etter tre ukers eksponering var det lav frekvens av MN fra blodet til både "0"-prøvefisk og til kontrollfisk. Dette indikerer at MN frekvensen i kontrollfisk representerte et bakgrunnsnivå i forsøket. Studiene til Barsiene *et al.* (2005) av torsk eksponert i et gjennomstrømningssystem for

subletale konsentrasjoner av bisfenol A, diallyl ftalat og til tetrabromodifenyletertorsk hadde blod fra kontrollfisk en MN frekvens på 0,22. I studier av Barsiene *et al.* (2006) av oljeeksponert torsk var det observert en MN frekvens på 0,46. Fra begge studiene av Barsiene *et al.* (2005; 2006) var det observert MN frekvenser fra kontrollfisk nærliggende nivåene i denne oppgaven.

DL, DH og AL hadde mellom ~15 og 9 ganger høyere frekvenser av MN formasjoner i forhold til kontrollen og viser genotoksisk respons på de lave konsentrasjonene av eksponeringen.

Genotoksisk respons på oljeeksponering er kjent fra en lang rekke studier (for eksempel Aas *et al.*, 2000; Barsiene, 2002; Bolognesi *et al.*, 2006; Holth *et al.*, 2009). Fiskene fra behandlingene EL, AL og EH hadde MN frekvenser på nivå med kontrollfisk og indikerte ingen induert genotoksisitet som følge av eksponeringen. Det uvisst hvor stor andel av skadde erytrocytter som elimineres fra det perifere blodet og i hvilken grad DNA-reparasjoner forekommer (Meier *et al.*, 1999; Buschini *et al.*, 2004; Cristaldi *et al.*, 2004). Dette kan gi varierende respons mellom arter, mellom individer av samme art og mellom vev i samme individ. .

5 Oppsummering og konklusjon

Juvenil torsk ble eksponert for forvitret olje og skipsdiesel. PAHene i vannprøvene og de respektive metabolittene bekreftet eksponering for økologisk relevante nivåer etter en uke med en påfølgende nedgang etter tre uker. Det ble vist at det relative bidraget av PAHene fra vannprøvene kan overvurderes og en analyse av metabolittene, som et internt mål på opptak i fiskene, anbefales.

Resultatene fra CYP1A mRNA fra leveren til torsken indikerte tydelig respons og konsentrasjonsavhengig fordeling relatert til eksponeringen etter en uke og vedvarende oppregulerte nivåer etter tre uker, i forhold til kontrollfisken.

Resultatene av kvantiteten av CYP1A proteiner fra leveren til torsken viste ingen signifikante responser forskjellige fra kontrollen etter en uke relatert til eksponeringen, men signifikante responser etter tre uker.

Resultatene av CYP1A enzym aktivitet (EROD) fra leveren til torsken viste signifikante responser etter en uke og signifikante samt konsentrasjonsavhengige responser etter tre uker relatert til eksponeringen, i forhold til kontrollfisken. Videre indikerte resultatene hemmet EROD aktivitet i leveren til torsken eksponert for dieselbehandlingene.

Resultatene fra gjellene til torsken indikerte økt CYP1A enzym aktivitet (EROD) relatert til oljebehandlingene etter en uke og viste signifikant konsentrasjonsavhengig respons i oljebehandlingene etter tre uker, i forhold til kontrollfisken. Videre indikerte resultatene hemmet EROD aktivitet i gjellene til torsken eksponert for dieselbehandlingene.

I karakteriseringen av frekvens av mikronukleusdannelse i røde blodlegemer relatert til eksponering for forvitret olje og diesel var det indikasjoner på genotoksiske responser for eksponeringen etter tre uker. Torsk fra dieselbehandlingene hadde høyere frekvens av MN enn oljebehandlingene.

Biomarkørene brukt i denne oppgaven viser godt samsvar mellom eksponering for forvitret olje og skipsdiesel.

Appendix A: Konsentrasjon i vann etter en og tre uker

Behandling 1 uke (ng/l vann)	Kontroll	Kontroll	Kontroll	AL	AL	AL	AH	AH	AH	EL	EL	EL	AH	AH	AH	DL	DL	DL	DH	DH	DH
Replikant	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
PHE	1,8	1,6	1,2	3,2	2,4	7,2	14,1	8,9	8,2	3,2	3,2	4,6	10,9	50,9	17,5	3,7	4,0	2,2	26,8	71,5	3,1
1 MDBT	0,1	nd	nd	8,5	8,9	36,4	62,0	41,0	41,3	1,1	1,1	1,0	6,3	4,7	3,9	0,5	0,2	nd	1,2	1,2	0,4
1 MP	0,3	0,4	nd	2,0	1,9	7,8	14,6	7,4	7,9	3,2	3,1	6,5	15,2	34,7	18,8	3,5	3,5	1,1	19,6	46,6	nd
2 MA	Nd	nd	nd	-	0,4	0,3	-	0,4	0,4	-	0,4	0,4	-	1,2	1,1	-	1,1	0,2	-	0,9	nd
2 MP	0,4	0,5	nd	2,8	2,6	11,4	14,1	10,8	10,0	4,5	5,0	9,9	9,4	35,1	15,5	5,3	5,9	1,7	17,2	53,2	nd
2,1 BNT	0,9	0,3	nd	2,1	1,5	2,9	2,4	1,6	1,9	0,8	1,0	1,1	1,0	0,7	0,8	0,3	nd	nd	0,2	nd	nd
3 MP	0,2	0,4	nd	1,6	1,5	6,8	8,3	6,5	6,1	2,2	2,1	4,8	5,2	25,4	10,9	2,0	2,8	0,6	11,1	34,6	nd
3+2 MDBT	0,2	nd	nd	11,7	12,2	53,5	87,1	57,9	57,4	1,0	0,8	1,2	5,2	5,4	3,7	0,7	1,5	nd	2,2	1,0	0,1
4 MDBT	0,9	nd	nd	13,4	15,0	64,9	90,4	66,3	65,4	3,7	2,2	3,2	15,5	14,2	11,0	1,9	0,9	nd	3,4	1,6	1,2
9 MP+1 MA	0,5	0,6	nd	4,1	4,8	20,0	31,2	19,9	20,0	2,7	9,1	13,0	63,8	55,6	46,3	8,1	8,1	1,9	42,9	84,0	nd
ACENAPHTENE	0,5	0,4	nd	1,2	0,5	1,2	2,7	1,8	1,4	2,2	1,8	0,9	12,9	13,9	4,6	4,4	3,5	1,9	31,1	31,4	11,6
ACENAPHTHYLENE	-	nd	nd	-	nd	nd	-	nd	nd	-	0,8	nd	-	1,1	1,7	-	0,4	nd	-	1,1	1,5
AN	0,5	nd	nd	0,4	nd	nd	1,7	nd	0,4	0,5	0,3	nd	2,0	2,2	1,3	0,8	0,6	0,7	4,0	4,1	1,6
BAA	0,9	0,3	nd	0,6	0,2	0,5	0,3	nd	nd	0,3	0,7	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	nd	nd	0,3	nd	nd
BAP	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BBF+BKF+BJF	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BEP	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BP	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
CHRYL +TRIPH	1,0	0,3	nd	1,5	1,0	1,6	1,3	1,0	1,1	4,9	5,5	4,5	7,2	4,5	4,5	1,1	0,7	0,4	1,1	1,1	1,0
DacA + DahA	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
DBT	0,8	nd	nd	6,4	5,6	23,5	82,5	41,3	42,7	1,1	0,7	0,9	9,5	9,5	6,4	0,9	0,9	nd	2,8	2,5	0,6
FLUO	1,0	0,5	0,4	1,2	0,9	1,7	1,0	0,8	0,4	0,9	1,0	0,7	1,9	1,7	1,3	1,2	1,0	0,4	1,9	3,2	2,4
FLUORENE	0,5	2,1	nd	1,8	1,6	3,8	13,1	8,2	6,6	4,1	4,0	2,9	57,3	46,6	34,1	8,9	10,4	4,4	99,2	220,0	21,7
IP	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PER	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PYR	1,1	0,5	0,4	1,5	1,3	2,4	1,7	1,2	1,0	2,8	2,7	2,0	5,6	3,8	3,3	2,8	1,9	1,1	4,5	6,4	4,3
Σ DMN	26,2	30,3	13,4	97,1	106,2	234,9	1133,5	452,3	422,7	103,8	111,9	73,6	729,4	1607,8	771,6	174,1	225,9	62,4	1783,7	4046,7	128,2
Σ DMP	6,9	4,7	nd	28,2	26,2	63,7	80,9	40,3	42,6	55,6	48,5	54,7	143,7	100,8	78,4	58,8	47,3	18,4	96,2	156,5	55,1
Σ MCHRYL	Nd	nd	nd	0,5	nd	nd	0,7	nd	nd	2,7	3,0	3,3	3,8	3,8	3,1	0,4	nd	nd	0,4	nd	nd
Σ MN	17,0	17,1	6,0	57,3	47,8	43,6	374,1	148,0	98,4	51,5	51,8	23,3	173,1	512,5	179,7	70,7	79,5	20,0	637,4	1109,8	18,9
Σ TeMN	18,7	33,2	nd	112,1	212,4	714,5	709,4	685,8	578,1	138,8	200,1	199,5	431,9	631,5	564,5	218,6	374,9	87,5	564,1	2112,7	452,3
Σ TMN	24,2	28,6	10,3	131,8	174,3	675,4	1551,1	1010,9	918,1	155,3	182,2	173,0	889,8	1594,6	1129,8	259,9	315,3	83,2	1521,3	4714,0	263,6
Σ TMP	4,5	3,4	nd	15,4	16,0	22,4	23,6	16,1	16,8	28,6	21,3	22,7	53,8	32,1	25,9	30,1	21,0	8,4	30,1	42,2	26,9

Behandling 3 uker (ng/l vann)	Kontroll	Kontroll	Kontroll	AL	AL	AL	AH	AH	AH	EL	EL	EL	EH	EH	EH	DL	DL	DL	DH	DH
Replikat	1	2	3	1	2	4	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2
PHE	1,2	2,3	3,4	4,1	2,8	0,9	3,1	2,5	3,1	1,0	2,5	2,6	2,6	1,1	4,1	2,2	1,6	2,2	2,4	4,5
1 MDBT	nd	nd	nd	0,4	0,2	nd	0,3	nd	nd	nd	nd	nd	0,2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1 MP	nd	0,4	0,8	0,4	0,4	nd	0,5	0,3	0,4	nd	0,4	0,4	0,3	nd	0,7	nd	nd	nd	nd	0,7
2 MA	nd	nd	nd	0,4	nd	nd	0,3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2 MP	nd	0,7	1,1	0,9	0,6	nd	0,6	0,3	0,5	nd	0,5	0,7	0,5	nd	0,6	nd	nd	nd	nd	1,0
2,1 BNT	nd	nd	nd	nd	0,4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,4	0,5	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3 MP	nd	0,6	0,9	0,7	0,4	nd	0,7	0,4	0,3	nd	0,4	0,5	0,5	nd	0,6	nd	nd	nd	nd	1,0
3+2 MDBT	nd	nd	nd	0,5	0,2	nd	0,3	nd	nd	nd	nd	nd	0,2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4 MDBT	nd	nd	nd	0,5	0,3	nd	0,8	nd	nd	nd	nd	nd	0,6	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
9 MP+1 MA	nd	0,6	0,9	0,7	0,7	nd	0,5	0,3	0,4	nd	0,4	0,5	0,7	nd	0,6	nd	nd	nd	nd	1,1
ACENAPHTENE	nd	0,7	nd	0,7	1,2	1,2	0,8	1,2	1,0	nd	0,8	0,7	1,0	nd	0,9	nd	nd	nd	nd	0,7
ACENAPHTHYLENE	nd	nd	nd	0,8	1,9	nd	1,1	0,9	1,3	nd	1,1	0,4	1,2	nd	1,8	nd	nd	0,7	1,4	1,6
AN	nd	nd	0,5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,5	0,6	0,5	0,9	nd	nd
BAA	nd	0,2	nd	nd	0,4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,1	0,4	0,3	nd	nd	nd
BAP	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BBF+BKF+BJF	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BEP	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BP	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
CHRYL +TRIPH	nd	0,3	nd	nd	nd	nd	1,1	1,0	0,8	2,2	1,7	2,6	4,2	5,2	3,7	0,7	0,5	0,4	0,7	0,7
DacA + DahA	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
DBT	nd	nd	nd	0,4	0,3	nd	0,2	0,4	0,2	nd	0,2	nd	0,3	nd	0,5	nd	nd	nd	nd	nd
FLUO	0,4	0,8	1,1	0,8	0,6	0,3	0,5	0,7	0,5	0,4	0,7	1,1	0,7	0,3	1,1	1,1	0,9	0,8	0,7	0,9
FLUORENE	0,6	0,5	1,1	1,6	1,3	0,5	1,2	0,9	0,9	0,3	0,7	0,8	1,1	0,4	1,1	1,0	0,7	1,3	1,6	1,5
IP	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PER	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PYR	0,3	0,4	1,1	0,7	0,7	0,3	0,6	0,7	0,6	0,5	0,6	0,8	1,5	1,6	0,9	0,9	0,7	0,8	0,7	1,0
Σ DMN	20,4	22,6	28,5	23,6	30,9	23,2	28,5	19,9	29,7	13,4	16,8	25,6	22,9	14,4	18,7	20,9	13,9	19,7	5,2	3,7
Σ DMP	nd	nd	nd	5,1	6,8	nd	5,1	6,2	nd	nd	nd	nd	9,6	6,4	6,6	7,8	nd	nd	11,1	10,2
Σ MCHRYL	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3,5	5,0	2,3	nd	nd	nd	nd	nd
Σ MN	13,5	6,8	15,0	14,4	27,9	12,4	15,6	12,9	22,9	5,7	11,1	12,8	9,9	5,6	9,7	13,0	3,9	14,1	6,8	4,9
Σ TeMN	nd	nd	nd	nd	nd	nd	14,2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	17,3	23,2	20,2	nd	nd	24,5	22,1
Σ TMN	16,6	18,8	24,3	22,3	30,3	16,7	20,2	25,6	33,1	16,0	14,4	14,5	21,5	22,0	27,8	23,1	15,5	22,0	11,9	8,6
Σ TMP	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	10,7	12,1	9,2	6,9	nd	nd	8,9	10,3

Ordforklaring for konsentrasjoner i vann:

PHE	phenanthrene
AN	anthracene
ACY	acenaphthylene
ACE	acenaphthene
F	fluorene
FLUO	fluoranthene
PYR	pyrene
BAA	benzo(a)anthracene
CHRY S +TRIPH	chrysene + triphenylene
BBF+BKF+BJF	benzo(b)fluoranthene + benzo(j)fluoranthene+ benzo(k)fluoranthene
BEP	benzo(e)pyrene
BAP	benzo(a)pyrene
PER	perylene
IP	indeno(1,2,3 c-d)pyrene
DacA + DahA	dibenzo(ah)anthracene + dibenzo(ac)anthracene
BP	benzo(ghi)perylene
2,1 BNT	2,1 benzonapthothiophene
DBT	dibenzothiophene
2MN	2 methyl-naphtalene
1MN	1 methylNaphtalene
Σ DMN	Σ dimethylnaphtalene
Σ TMN	Σ trimethylnaphtalene
Σ TeMN	Σ tetramethylnaphtalene
4 MDBT	4 methyl dibenzothiophene
3+2 MDBT	3 methyl dibenzothiophene + 2 methyl dibenzothiophene
1 MDBT	1 methyl dibenzothiophene
3 MP	3 methylphenanthrene
2 MP	2 methylphenanthrene
2 MA	5 methylanthracene
9 MP+1 MA	9 methylphenanthrene + 1 methylanthracene
1 MP	1 methylphenanthrene
Σ DMP	Σ dimethylphenanthrene
Σ TMP	Σ trimethylphenanthrene
Σ MCHRY S	Σ methylchrysene

Appendix B: Gallemetabolitter

Behandling 1 uke (ng/g)	SUM OH- naftalen	2-OH-bifenyyl	SUM-OH- fenantren	3-OH-fluoren	1-OH-pyren	1-OH-krysen	SUM-OH- B(a)P	SUM OH-PAH
Kontroll	46,0	6,9	207,7	58,6	174,0	21,8	26,5	541,6
Kontroll	32,7	1,3	87,7	25,0	68,5	6,9	13,0	235,1
Kontroll	52,1	16,8	99,4	49,0	92,9	15,3	27,5	353,0
Arabian light Lav	48,3	13,4	290,8	nd	1041,1	31,6	96,3	1521,5
Arabian light Lav	25,4	59,9	107,3	nd	203,7	29,2	24,2	449,8
Arabian light Høy	9,6	7,1	111,2	nd	261,2	12,2	26,7	428,0
Arabian light Høy	25,0	60,1	289,6	19,0	277,7	58,5	27,7	757,6
Arabian light Høy	94,7	5,9	296,0	nd	500,6	23,0	53,3	973,4
Ekofisk Lav	119,3	27,6	896,9	nd	860,4	88,3	113,8	2106,3
Ekofisk Lav	31,3	19,4	145,3	nd	303,6	56,5	73,9	630,0
Ekofisk Lav	196,7	7,0	1564,7	27,4	1189,1	126,1	187,9	3299,0
Ekofisk Høy	38,8	1,0	287,6	6,6	193,9	51,8	2,7	582,3
Ekofisk Høy	45,1	1,2	699,6	nd	537,5	59,0	68,4	1410,8
Ekofisk Høy	34,0	26,7	138,9	nd	271,2	25,9	38,5	535,1
Diesel Lav	85,7	25,9	1011,3	nd	1173,7	38,1	10,3	2345,0
Diesel Lav	32,7	21,5	503,7	29,3	658,8	22,4	13,2	1281,5
Diesel Lav	481,6	24,9	1509,0	81,2	1230,9	26,8	14,0	3368,4
Diesel Høy	42,1	1,4	1281,4	42,4	840,2	23,4	6,2	2236,9
3 uker (ng/g)								
Kontroll	57,7	24,3	215,3	58,1	179,4	21,9	42,6	599,3
Kontroll	36,4	12,3	114,5	30,5	70,9	7,7	21,2	293,5
Arabian light Lav	5,6	36,5	52,7	10,8	117,5	35,1	65,9	324,1
Arabian light Lav	5,2	14,7	47,3	5,7	35,0	5,3	7,3	120,4
Arabian light Lav	4,1	9,4	132,1	9,8	83,1	41,3	31,3	311,1
Arabian light Høy	0,6	3,3	38,3	0,9	25,0	20,7	13,8	102,5
Arabian light Høy	nd	nd	4,7	nd	41,8	nd	35,3	81,8
Arabian light Høy	0,8	9,4	3,4	nd	44,6	14,4	19,4	92,0
Ekofisk Lav	6,7	13,6	40,7	2,6	185,1	106,8	193,2	548,6
Ekofisk Lav	9,5	51,7	1457,0	15,8	69,5	120,1	80,6	1804,1
Ekofisk Lav	148,2	26,9	336,2	nd	315,4	137,5	142,2	1106,3
Ekofisk Høy	5,8	10,4	17,8	nd	161,4	63,3	88,6	347,3
Ekofisk Høy	5,8	91,5	37,8	nd	69,0	61,3	48,9	314,4
Ekofisk Høy	6,8	17,1	37,7	3,3	142,7	73,4	91,2	372,1
Diesel Lav	7,7	13,9	57,2	6,2	149,6	21,1	12,5	268,2
Diesel Lav	12,5	4,3	274,7	14,0	442,5	17,9	35,3	801,2
Diesel Lav	5,9	13,6	269,3	nd	366,0	3,7	25,8	684,3
Diesel Høy	2,5	4,5	172,8	12,3	498,8	14,2	14,8	719,8
Diesel Høy	7,2	13,0	68,8	9,3	160,8	31,5	6,6	297,3
Diesel Høy	4,1	6,8	168,9	23,2	675,2	15,1	17,1	910,3

Appendix C: Bearbeidede data for torsk

Kode fisk	Lengde	Vekt	Olje/diesel	Dose	Replikat	Uker eksponering	Sum OH-PAH	1-OH-pyren	CYP1A mRNA	CYP1A proteiner	EORD gjelle	EROD lever	MN
0	17,5	42,05	-	-	-	0	-	-	20572,9	66,8	0,5	1,0	0
0	17,5	41,43	-	-	-	0	-	-	30900,5	5,6	0,8	0,6	1
0	19	56,70	-	-	-	0	-	-	112096,8	124,3	1,1	0,0	0
0	19	52,86	-	-	-	0	245,0	109,0	75027,7	7,4	0,9	1,9	0
0	17	38,90	-	-	-	0	193,0	79,0	905,8	120,9	0,2	1,8	1
0	17,8	47,24	-	-	-	0	-	-	334,7	6,2	-0,3	1,0	0
0	16,5	39,63	-	-	-	0	207,0	81,0	700,7	40,6	0,2	1,2	0
0	16	33,38	-	-	-	0	-	-	199,5	7,5	0,2	1,1	1
AH7	18,5	60,15	Arabian	Høy	1	1	428,0	261,2	20572,9	65,4	12,8	0,7	2
AH7	17	43,91	Arabian	Høy	2	1	-	-	30900,5	101,2	2,8	1,9	0
AH7	15,5	31,31	Arabian	Høy	3	1	757,6	277,7	112096,8	108,0	13,3	2,3	-
AH7	18,8	53,64	Arabian	Høy	4	1	973,4	500,6	75027,7	43,2	3,4	2,2	-
AL7	18,7	53,96	Arabian	Lav	1	1	1521,5	1041,1	8408,8	55,3	5,0	1,3	0
AL7	17,7	53,05	Arabian	Lav	2	1	449,8	203,7	5187,1	98,0	1,7	0,7	0
AL7	16,4	34,68	Arabian	Lav	4	1	-	-	3891,4	7,0	1,9	1,2	-
KTR7	16	33,19	Kontroll	Kontroll	1	1	541,6	174,0	905,8	48,4	2,4	0,8	
KTR7	17	42,2	Kontroll	Kontroll	2	1	235,1	68,5	334,7	113,2	1,1	0,5	0
KTR7	18,6	51,21	Kontroll	Kontroll	3	1	353,0	92,9	700,7	3,9	0,8	-0,3	-
KTR7	18,2	53,3	Kontroll	Kontroll	4	1	-	-	199,5	56,6	1,1	0,1	-
DH7	18,5	62,29	Diesel	Høy	1	1	-	-	5789,5	46,0	4,9	0,1	-
DH7	16,5	34,05	Diesel	Høy	3	1	2236,9	840,2	21810,2	6,5	-0,3	1,0	-
DL7	17	38,87	Diesel	Lav	1	1	2345,0	1173,7	8408,8	62,5	9,4	0,8	0
DL7	18	52,43	Diesel	Lav	2	1	-	-	5187,1	55,4	0,7	0,4	-
DL7	20	68,53	Diesel	Lav	3	1	3368,4	1230,9	3891,4	12,6	1,7	0,4	-
DL7	16,3	34,02	Diesel	Lav	4	1	-	-	5789,5	64,3	1,0	1,5	-
EH7	18,7	55,34	Ekofisk	Høy	1	1	582,3	193,9	21810,2	2,7	9,4	1,4	-
EH7	16,8	39,3	Ekofisk	Høy	2	1	1410,8	537,5	142225,7	8,0	1,5	1,6	2
EH7	19,5	66,82	Ekofisk	Høy	3	1	-	-	96135,5		4,1	1,4	-
EH7	17,5	44,04	Ekofisk	Høy	4	1	-	-	93604,1	107,4	9,5	2,6	-
EL7	18	46,64	Ekofisk	Lav	1	1	2106,3	860,4	12770,4	82,1	5,4	4,7	0
EL7	17,1	39,35	Ekofisk	Lav	2	1	630,0	303,6	38964,9	94,6	6,5	2,4	-
EL7	18,8	48,87	Ekofisk	Lav	3	1	-	-	54347,1	75,7	4,5	2,0	-
EL7	18	52,65	Ekofisk	Lav	4	1	-	-	53985,9	73,0	8,6	2,0	-
AH21	18,2	49,35	Arabian	Høy	1	3	-	-	34671,6	197,5	4,8	6,6	0
AH21	19,3	60,31	Arabian	Høy	2	3	-	-	12749,6	94,3	3,1	2,4	-
AH21	18,9	52,07	Arabian	Høy	3	3	81,8	41,8	37249,5	142,0	2,5	6,8	2
AH21	18,5	56,16	Arabian	Høy	4	3	92,0	44,6	10149,0	34,4	5,3	3,6	5
AL21	17,5	47,9	Arabian	Lav	1	3	324,1	117,5	142225,7	4,5	3,2	2,7	1
AL21	17,2	39,96	Arabian	Lav	2	3	120,4	35,0	96135,5	40,6	2,2	1,1	-
AL21	20,5	68,74	Arabian	Lav	4	3	311,1	83,1	12770,4	32,1	2,2	3,2	0
KTRL21	18,8	48,88	Kontroll	Kontroll	1	3	-	-	312,8	6,3	0,4	0,6	0
KTRL21	17,8	49,11	Kontroll	Kontroll	2	3	-	-	56,2	8,4	0,4	1,2	1
KTRL21	18,7	58,68	Kontroll	Kontroll	3	3	599,3	179,4	1381,9	4,0	0,2	0,6	0
KTRL21	18	46,6	Kontroll	Kontroll	4	3	293,5	70,9	744,1	5,0	0,1	0,9	0
DH21	16,6	37,24	Diesel	Høy	1	3	-	-	38964,9	50,3	1,1	0,6	5

DH21	19,2	64,32	Diesel	Høy	2	3	719,8	498,8	54347,1	40,8	1,8	0,3	8
DH21	17,2	36,48	Diesel	Høy	3	3	297,3	160,8	53985,9	143,7	0,5	1,2	2
DH21	19,8	63,69	Diesel	Høy	4	3	910,3	675,2	34671,6	184,3	1,6	0,7	0
DL21	16,5	42,34	Diesel	Lav	1	3	-	-	705,5	8,6	1,2	1,5	5
DL21	17	41,19	Diesel	Lav	2	3	-	-	141,0	9,6	1,1	0,2	0
DL21	16,8	43,23	Diesel	Lav	3	3	801,2	442,5	976,1	13,2	1,3	1,2	4
DL21	19,2	53,27	Diesel	Lav	4	3	684,3	366,0	2835,4	16,1	-0,4	1,0	0
EH21	15,7	30,47	Ekofisk	Høy	1	3	347,3	161,4	17803,0	67,5	3,2	2,5	-
EH21	16,7	39,24	Ekofisk	Høy	2	3	-	-	17228,7	53,9	2,8	3,3	0
EH21	19,4	52,79	Ekofisk	Høy	3	3	314,4	69,0	59644,1	3,7	4,0	4,6	0
EH21	18,3	49,01	Ekofisk	Høy	4	3	372,1	142,7	44398,1	156,1	2,5	2,5	1
EL21	16,6	38,61	Ekofisk	Lav	1	3	-	-	23614,0	48,1	3,4	1,9	0
EL21	17,5	43,13	Ekofisk	Lav	2	3	-	-	18099,4	3,1	4,1	1,4	1
EL21	17,5	43,24	Ekofisk	Lav	3	3	1804,1	69,5	18468,5	73,5	2,7	2,9	2
EL21	18,3	49,01	Ekofisk	Lav	4	3	1106,3	315,4	37820,6	127,0	2,9	2,7	0

Sum OH-PAH: ng/g galle; 1-OH-pyren: ng/g galle; CYP1A mRNA: gjennomsnittlig normal ekspresjon; CYP1A proteiner: mOD/ug prot; EROD gjelle: pmol/min/filament ; EROD lever: pm/min/mg protein; MN: antall mikronukleus; AL: Arabian light lav; AH: Arabian light høy; EL: Ekofisk lav; EH: Ekofisk Høy; DL: diesel lav; DH: diesel høy; KTRL: kontroll; 7 = 1 uke, 21 = 3 uker.

Ukjente prøve	Dager eksponert	MN
Ukjent 1	7	1
Ukjent 2	7	5
Ukjent 3	7	0
Ukjent 4	7	0
Ukjent 5	7	1
Ukjent 6	7	0
Ukjent 7	7	0
Ukjent 8	7	5
Ukjent 9	7	1
Ukjent 10	7	0
Ukjent 11	7	0
Ukjent 12	7	0
Ukjent 13	7	0
Ukjent 14	7	0
Ukjent 15	7	0
Ukjent 16	7	0
Ukjent 17	7	1
"Prøve nr 1"	21	2
"Prøve nr 2"	21	0
"Prøve nr 3"	21	2

MN: antall mikronukleus.

Appendix D: Buffere og løsninger

HEPES-Courtland buffer:	1 liter	2 liter
KCl	0,38 g	0,8 g
NaCl	7,74 g	15 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,23 g	0,5 g
CaCl*2H ₂ O	0,23 g	0,5 g
NaH ₂ PO*2H ₂ O	0,372 g	0,7 g
HEPES	1,43 g	2,9 g
Glukose	1 g	2 g
pH justeres med NaOH	-	-

EROD-gjellebuffer:	
HEPES-Courtland buffer (pH 7,7)	35 mL
Dicumarol (1 mM)	35 µL
Etoksy-resorufin (10 mM) løst i DMSO	70 µL

Homogeniseringsbuffer (pH 7,7)	
K-fosfatbuffer	0,1 M
KCl	0,15 M
DTT	1 mM
Glyserol	5%

Resuspenderingsbuffer (mikrosomal fraksjon)	
K-fosfatbuffer	0,1 M
KCl	0,15 M
EDTA	1 mM
Glyserol	20%

Fortynningsbuffer (pH 8,0) (proteinanalyse)	
Tris-buffer	0,1 M

Coatingbuffer (pH 9,6) (CYP1A ELISA)	
Karbonat-bikarbonat	0,05 M

TTBS (CYP1A ELISA)	
Tris-buffer (pH 8,5)	20 mM
NaCl	0,5 M
Tween-20	0,0005%

Blokkeringsløsning (CYP1A ELISA)

TTBS

BSA 1%

Antistoffbuffer (CYP1A ELISA)

TTBS

BSA 0,1%

Fikseringsløsning (MN)

Metanol:eddiksyre 3:1

Giemsa løsning (MN)

Giemsa 3%

H₂O 97%

Appendix E: Kjemikalieliste

Kjemikalier	Leverandør
Glukose	Sigma-Aldrich
EDTA	Sigma-Aldrich
Dicumarol	Sigma-Aldrich
Eukitt lim	Sigma-Aldrich
Heparin	Sigma-Aldrich
Trizma Base	Sigma-Aldrich
Trizma HCl	Sigma-Aldrich
Giemsa	Sigma-Aldrich
Karbonat-biokarbonat buffer kapsler	Sigma-Aldrich
Glycerol	Sigma-Aldrich
DTT (dithiotreitol)	Sigma-Aldrich
Bovin gammaglobulin	Sigma-Aldrich
Metanol:edikksyre	Sigma-Aldrich
HEPES	Sigma-Aldrich
Tween-20	Sigma-Aldrich
Etoksy-resorufin	Sigma-Aldrich
BSA	Sigma-Aldrich
Diklormetan (DCM)	Sigma-Aldrich
dH ₂ O	Produsert på lab
NaOH	Merck
KCl	Merck
DMSO	Merck
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	Merck
NaCl	Merck
KH ₂ PO ₄	Merck
K ₂ PO ₄	Merck
KCl	Merck
CaCl ₂	Merck
MgSO ₄	Merck
TMB	Kem-En-Tech Diagnostics A/S
Sekundærantistoff (goat-anti rabbit – GAR)	Biosense Laboratories
Primærantistoff (anti-fisk CYP1A - CP226)	Biosense Laboratories
Reagens A (alkalisk kobber tartarløsning)	Bio-Rad
Reagens B (fortynnet Folins reagens)	Bio-Rad
Triacine (MS-222)	Sigma-Aldrich

Appendix F: Utsyrsliste

Utstyr

Akvarium (20L)
Myke PVC silikonslanger
Medisinflasker, brune
NUNC immuno 96 MicroWell
Kullfilter
Begerglass
Magnetrører
Avtreksskap
Sprøyter
Objektglass
Ultracentrifuge Sorvall MTX 150 MicroUltra
JMP ® 9.0.0 (9.0)
24-brønners mikrotiterplate
96-brønns mikrotiterplate
E.Z.N.A.® Total RNA Kit
SkanWasher300
Pipetter og multipipette
MacBook
Kolonner til oljegrus
Janke & Kunkel drill
GraphPad Prism 5,0d for Mac OS X
Mikroskop (Olympus BX41)
Peristaltiske pumper (Watson Marlow 520S)
Teflonslanger
Plateleser (Biotek FLx800)
Plateleser (Biotek synergyMx)
Plateleser (Biotek SynergyMx)
Headertank
Akvariegrus
Eppendorfrør
Kryorør
Potter-Elvehjem Teflon ® homogeniseringssett

Leverandør

VWR International
VWR International
VWR International
VWR International
VWR International
VWR International
VWR International
UiO
VWR International
VWR International
Sorvall Instruments
SAS Institute Inc.
Sarstedt
Sarstedt
Omega Biotek, VWR International
NIVA/UiO
NIVA/UiO
Macintosh
Laget på insittuttet (teknisk avdeling)
Janke & Kunkel
GraphPad Software, Inc.
CSIC (Spain)
Christian Berner AS
Christian Berner AS
Biotek
Biotek
Biotek
Biologen UiO
Akvariemagasinet (Lørenveien 38b, Oslo)
VWR International
VWR International
VWR International

Referanseliste

- Aas, E., T. Baussant, L. Balk, B. Liewenborg og O. K. Andersen (2000). "PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod." Aquatic toxicology 51(2): 241-258.
- Aas, E., Barsiene, J., Lazutka, J., and Sanger, R. 2002. Micronuclei analyses of blue mussels and cod following exposure to dispersed crude oil. Report AM 2002/011: 33.
- Abrahamson, A., I. Brandt, B. Brunström, R. C. Sundt og E. H. Jørgensen (2008). "Monitoring contaminants from oil production at sea by measuring gill EROD activity in Atlantic cod (*Gadus morhua*)."
Environmental pollution 153(1): 169-175.
- Addison, R.F., Edwards, A.J., (1988). Hepatic microsomal monooxygenase activity in flounder *Platichthys flesus* from polluted sites in Langesundfjord and from mesocosms experimentally dosed with diesel oil and copper. Marine Ecology-Progress Series 46.: 51–54.
- Andersson, T. og L. Förlin (1992). "Regulation of cytochrome-P450 enzyme-system in fish." Aquatic toxicology 24(1-2): 1-19.
- Ariese, F., S. J. Kok, M. Verkaik, C. Gooijer, N. H. Velthorst og J. W. Hofstraat (1993). "Synchronous fluorescence spectrometry of fish bile - a rapid screening method for the biomonitoring of PAH exposure." Aquatic toxicology 26(3-4): 273-286.
- Atlas, R. M., P. D. Boehm og J. A. Calder (1981). "Chemical and biological weathering of oil, from the Amoco Cadiz spillage, within the littoral zone." Estuarine, Coastal and Shelf Science 12(5): 589-608.
- B. Rees, C., S. D. McCormick, J. P. Vanden Heuvel og W. Li (2003). "Quantitative PCR analysis of CYP1A induction in Atlantic salmon (*Salmo salar*)."
Aquatic toxicology 62(1): 67-78.
- Barsiene, J. (2002). "Genotoxic impacts in Klaipeda Marine port and Butinge oil terminal areas (Baltic Sea)."
Marine environmental research 54(3-5): 475-479.
- Barsiene, J., V. Dedonyte, A. Rybakovas, L. Andreikenaite og O.-K. Andersen (2005). "Induction of micronuclei in Atlantic cod (*Gadus morhua*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) after treatment with bisphenol A, diallyl phthalate and tetrabromodiphenyl ether-47." Ekologija 4: 1-7.
- Barsiene, J., V. Dedonyte, A. Rybakovas, L. Andreikenaite og O. K. Andersen (2006). "Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil." Aquatic toxicology 78 Suppl 1: S99-104.
- Baumard, P., H. Budzinski, P. Garrigues, H. Dizer og P. D. Hansen (1999). "Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments and mussels (*Mytilus edulis*) from the Western Baltic Sea: occurrence, bioavailability and seasonal variations." Marine environmental research 47(1): 17-47.
- Baussant, T., S. Sanni, A. Skadsheim, G. Jonsson, J. F. Borseth og B. Gaudebert (2001). "Bioaccumulation of polycyclic aromatic compounds: 2. Modeling, bioaccumulation in marine organisms chronically exposed to dispersed oil." Environmental Toxicology and Chemistry 20(6): 1185-1195.
- Beyer, J., M. Sandvik, K. Hylland, E. Fjeld, E. Egaas, E. Aas, J. U. Skare og A. Goksoyr (1996). "Contaminant accumulation and biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus* L) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L) exposed by caging to polluted sediments in Sorfjorden, Norway." Aquatic toxicology 36(1-2): 75-98.
- Bolognesi, C., E. Perrone, P. Roggeri, D. M. Pampanin og A. Sciutto (2006). "Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions." Aquatic toxicology 78 Suppl 1: S93-98.
- Bucheli, T. D. og K. Fent (1995). "Induction of cytochrome-P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems." Critical Reviews in Environmental Science and Technology 25(3): 201-268.

- Budzinski, H., O. Mazéas, J. Tronczynski, Y. Désaunay, G. Bocquené og G. Claireaux (2004). "Link between exposure of fish (*Solea solea*) to PAHs and metabolites: Application to the "Erika" oil spill." Aquatic Living Resources 17(3): 329-334.
- Burke, M. D. og R. T. Mayer (1974). "Ethoxyresorufin - direct fluorimetric assay fo a microsomal o-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholantrene." Drug Metabolism and Disposition 2(6): 583-588.
- Buschini, A., A. Martino, B. Gustavino, M. Monfrinotti, P. Poli, C. Rossi, A. Santoro, A. M. Dorr og M. Rizzoni (2004). "Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization." Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 557(2): 119-129.
- Carls, M. G., S. D. Rice og J. E. Hose (1999). "Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part I. Low-level exposure during incubation causes malformations, genetic damage, and mortality in larval Pacific herring (*Clupea pallasii*)." Environmental Toxicology and Chemistry 18(3): 481-493.
- Collier, T. K. og U. Varanasi (1991). "Hepatic activities of xenobiotic metabolizing enzymes and biliary levels of xenobiotics in english sole (&i&t;Parophrys vetulus&i&t;) exposed to environmental contaminants." Archives of Environmental Contamination and Toxicology 20(4): 462-473.
- Correia, M. A. (1991). [30] Cytochrome P450 turnover. Methods in Enzymology. E. F. J. Michael R. Waterman, Academic Press. Volume 206: 315-325.
- Cowles, M. og C. Davis (1982). "Is the .05 level subjectively reasonable." Canadian Journal of Behavioural Science-Revue Canadienne Des Sciences Du Comportement 14(3): 248-252.
- Cristaldi, M., L. A. Ieradi, I. Udroi og R. Zilli (2004). "Comparative evaluation of background micronucleus frequencies in domestic mammals." Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 559(1-2): 1-9.
- Dignam, J. D. (1990). [15] Preparation of extracts from higher eukaryotes. Methods in Enzymology. P. D. Murray, Academic Press. Volume 182: 194-203.
- Dunn, O. J. (1964). "Multiple Comparisons Using Rank Sums." Technometrics 6(3): 241-252.
- Dunnett, C. W. (1955). "A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control." Journal of the American Statistical Association 50(272): 1096-1121.
- Eason, C. og K. O'Halloran (2002). "Biomarkers in toxicology versus ecological risk assessment." Toxicology 181: 517-521.
- Eggens, M. L., A. Opperhuizen og J. P. Boon (1996). "Temporal variation of CYP1A indices, PCB and 1-OH pyrene concentration in flounder, *Platichthys flesus*, from the Dutch Wadden Sea." Chemosphere 33(8): 1579-1596.
- Ericson, G., E. Lindesjoo og L. Balk (1998). "DNA adducts and histopathological lesions in perch (*Perca fluviatilis*) and northern pike (*Esox lucius*) along a polycyclic aromatic hydrocarbon gradient on the Swedish coastline of the Baltic Sea." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 55(4): 815-824.
- EU (European Union), (2007). Europa – SCADplus – Activities of the European Union. Summaries of EU legislation. <http://europa.eu/scadplus/leg/en/lvb/l24230.htm>.
- Fan, J. S., X. L. Yang, W. G. Wang, W. H. Wood, K. G. Becker og M. Gorospe (2002). "Global analysis of stress-regulated mRNA turnover by using cDNA arrays." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99(16): 10611-10616.
- French, B. L., W. L. Reichert, T. Hom, M. Nishimoto, H. R. Sanborn og J. E. Stein (1996). "Accumulation and dose-response of hepatic DNA adducts in English sole (*Pleuronectes vetulus*) exposed to a gradient of contaminated sediments." Aquatic toxicology 36(1-2): 1-16.
- Gagnon, M. M. og D. A. Holdway (2000). "EROD induction and biliary metabolite excretion following exposure to the water accommodated fraction of crude oil and to chemically dispersed crude oil." Archives of Environmental Contamination and Toxicology 38(1): 70-77.

- Galgani F. og Payne J., (1991): Biological effects of contaminants: Microplate method for measurement of ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) in fish. Techniques in Marine Environmental Sciences No 13. ICES, Palægade 2-4. DK-1267 Copenhagen K. Denmark: 11.
- George, S., M. Gubbins, A. MacIntosh, W. Reynolds, V. Sabine, A. Scott og J. Thain (2004). "A comparison of pollutant biomarker responses with transcriptional responses in European flounders (*Platichthys flesus*) subjected to estuarine pollution." Marine environmental research 58(2-5): 571-575.
- George, S. G., J. S. Christiansen, B. Killie og J. Wright (1995). "Dietary crude-oil exposure during sexual-maturation induces hepatic mixed-function oxygenase (CYP1A) activity at very low environmental temperatures in polar cod (*Boregadus saida*)." Marine Ecology-Progress Series 122(1-3): 307-312.
- Goksøyr, A. (1991). "A semi-quantitative cytochrome P450IA1 ELISA: A simple method for studying the monooxygenase induction response in environmental monitoring and ecotoxicological testing of fish." Science of the Total Environment 101(3): 255-262.
- Goksøyr, A., J. Beyer, A. M. Husøy, H. E. Larsen, K. Westrheim, S. Wilhelmsen og J. Klungsøyr (1994a). "Accumulation and effects of aromatic and chlorinated hydrocarbons in juvenile atlantic cod (*Gadus morhua*) caged in a polluted fjord (Sørfjorden, Norway)." Aquatic toxicology 29(1-2): 21-35.
- Goksøyr, A., M. Bjørnevik og A. Maage (1994b). "Effects of dietary iron concentrations on the cytochrome-P450 system of atlantic salmon (*Salmo salar*)." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 51(2): 315-320.
- Goksøyr, A. og L. Forlin (1992). "The cytochrome-P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring." Aquatic toxicology 22(4): 287-311.
- Goksøyr, A., T. S. Solberg og B. r. Serigstad (1991). "Immunochemical detection of cytochrome P450IA1 induction in cod larvae and juveniles exposed to a water soluble fraction of North Sea crude oil." Marine pollution bulletin 22(3): 122-127.
- Grung, M., T. F. Holth, M. R. Jacobsen og K. Hylland (2009). "Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) metabolites in Atlantic cod exposed via water or diet to a synthetic produced water." Journal of toxicology and environmental health. Part A 72(3-4): 254-265.
- Guengerich, F. P. og T. Shimada (1991). "Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes." Chemical Research in Toxicology 4(4): 391-407.
- Haasch, M. L., E. M. Quardokus, L. A. Sutherland, M. S. Goodrich, R. Prince, K. R. Cooper og J. J. Lech (1992). "CYP1A protein and messenger-RNA in teleosts as an environmental bioindicator - laboratory and environmental studies." Marine environmental research 34(1-4): 139-145.
- Hagger, J. A., M. B. Jones, D. R. P. Leonard, R. Owen og T. S. Galloway (2006). "Biomarkers and integrated environmental risk assessment: Are there more questions than answers?" Integrated Environmental Assessment and Management 2(4): 312-329.
- Heddle, J. A. (1973). "A rapid in vivo test for chromosomal damage." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 18(2): 187-190.
- Hellou, J. og J. F. Payne (1987). "Assesment of contamination of fish by water-soluble fractions of petroleum - a role for bile mtabolites." Environmental Toxicology and Chemistry 6(11): 857-862.
- Holth, T. F., B. A. Beylich, H. Skarphedinsdottir, B. Liewenborg, M. Grung og K. Hylland (2009). "Genotoxicity of Environmentally Relevant Concentrations of Water-Soluble Oil Components in Cod (*Gadus morhua*)." Environmental Science & Technology 43(9): 3329-3334.
- Husøy, A. M., M. S. Myers og A. Goksøyr (1996). "Cellular localization of cytochrome P450 (CYP1A) induction and histology in Atlantic cod (*Gadus morhua* L) and European flounder (*Platichthys flesus*) after environmental exposure to contaminants by caging in Sørfjorden, Norway." Aquatic toxicology 36(1-2): 53-74.
- Hylland, K., Ruus, A., Børseth, J.F., Bechmann, R.K., Barsiene, J., Grung, M., Tollefsen, K.E., Myhre, L.P., (2006). Biomarkers in monitoring - a review. NIVA-Report 5205, Norwegian Institute for Water Resarch, Oslo: 106.
- Incardona, J., Teraoka, H., and Scholz, N. 2005. Aryl hydrocarbon receptor-independent toxicity of weathered crude oil during fish development. Environmental Health Perspectives, 113: 1755 – 1762.

- Jewett, S. C., T. A. Dean, B. R. Woodin, M. K. Hoberg og J. J. Stegeman (2002). "Exposure to hydrocarbons 10 years after the Exxon Valdez oil spill: evidence from cytochrome P4501A expression and biliary FACs in nearshore demersal fishes." Marine environmental research 54(1): 21-48.
- Johnson, L. L., S. Y. Sol, D. P. Lomax, G. M. Nelson, C. A. Sloan og E. Casillas (1997). "Fecundity and egg weight in English sole, *Pleuronectes vetulus*, from Puget Sound, Washington: Influence of nutritional status and chemical contaminants." Fishery Bulletin 95(2): 231-249.
- Jönsson, M. (2003). "EROD activity in gill filaments of anadromous and marine fish as a biomarker of dioxin-like pollutants." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 136(3): 235-243.
- Kammann, U. (2007). "PAH Metabolites in Bile Fluids of Dab (*Limanda limanda*) and Flounder (*Platichthys flesus*): Spatial Distribution and Seasonal Changes (7 pp)." Environmental Science and Pollution Research 14(2): 102-108.
- Kennedy, C. og A. Farrell (2005). "Ion homeostasis and interrenal stress responses in juvenile Pacific herring, , exposed to the water-soluble fraction of crude oil." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 323(1): 43-56.
- Kloeppersams, P. J. og J. J. Stegeman (1989). "The temporal relationships between P450E-protein content, catalytic activity, and messenger-RNA levels in the teleost *Fundulus heteroclitus* following treatment with beta-naphtaflavone." Archives of Biochemistry and Biophysics 268(2): 525-535.
- Krahn, M. M., D. G. Burrows, W. D. Macleod og D. C. Malins (1987). "Determination of individual metabolism of aromatic compounds in hydrolyzed bile of english sole (*Parophry vetulus*) from polluted sites in Puget sound, Washington." Archives of Environmental Contamination and Toxicology 16(5): 511-522.
- Lee, R. F. og J. W. Anderson (2005). "Significance of cytochrome P450 system responses and levels of bile fluorescent aromatic compounds in marine wildlife following oil spills." Marine pollution bulletin 50(7): 705-723.
- Le Dû-Lacoste et al., submitted for publication Le Dû-Lacoste, M., et al., (2008). Ph.D. Thesis, University of Bordeaux 1, France, Nr 3929: 377.
- Levene, H. (1960). "A robust approximate confidence-interval for components of variance." Annals of Mathematical Statistics 31(2): 534-535.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr og R. J. Randall (1951). "Protein measurment with folin phenol reagent." Journal of Biological Chemistry 193(1): 265-275.
- Mackay, D. og C. D. McAuliffe (1989). "Fate of hydrocarbons discharged at sea." Oil and Chemical Pollution 5(1): 1-20.
- Martinez-Gomez, C., J. A. Campillo, J. Benedicto, B. Fernandez, J. Valdes, I. Garcia og F. Sanchez (2006). "Monitoring biomarkers in fish (*Lepidorhombus boscii* and *Callionymus lyra*) from the northern Iberian shelf after the Prestige oil spill." Marine pollution bulletin 53(5-7): 305-314.
- Martinez-Gomez, C., A. D. Vethaak, K. Hylland, T. Burgeot, A. Kohler, B. P. Lyons, J. Thain, M. J. Gubbins og I. M. Davies (2010). "A guide to toxicity assessment and monitoring effects at lower levels of biological organization following marine oil spills in European waters." Ices Journal of Marine Science 67(6): 1105-1118.
- McKee, M. J., A. C. Hendricks og R. E. Ebel (1983). "Effects of naphthalene on benzo[a]pyrene hydroxylase and cytochrome P-450 in *Fundulus heteroclitus*." Aquatic toxicology 3(2): 103-114.
- Meador, J. P., J. Buzitis og C. F. Bravo (2008). "Using fluorescent aromatic compounds in bile from juvenile salmonids to predict exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons." Environmental Toxicology and Chemistry 27(4): 845-853.
- Meier, J. R., P. Wernsing og J. Torsella (1999). "Feasibility of micronucleus methods for monitoring genetic damage in two feral species of small mammals." Environmental and Molecular Mutagenesis 33(3): 219-225.
- Monteiro, P. R. R., M. A. Reis-Henriques og J. Coimbra (2000). "Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit in vitro ovarian steroidogenesis in the flounder (*Platichthys flesus* L.)." Aquatic toxicology 48(4): 549-559.

- Munkittrick, K. R., B. R. Blunt, M. Leggett, S. Huestis og L. H. McCarthy (1995). "Development of a sediment bioassay to determine bioavailability of PAHs to fish." Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery (Formerly Journal of Aquatic Ecosystem Health) 4(3): 169-181.
- Nahrgang, J., L. Camus, M. G. Carls, P. Gonzalez, M. Jonsson, I. C. Taban, R. K. Bechmann, J. S. Christiansen og H. Hop (2010a). "Biomarker responses in polar cod (*Boreogadus saida*) exposed to the water soluble fraction of crude oil." Aquatic toxicology 97(3): 234-242.
- Nahrgang, J., L. Camus, P. Gonzalez, M. Jonsson, J. S. Christiansen og H. Hop (2010b). "Biomarker responses in polar cod (*Boreogadus saida*) exposed to dietary crude oil." Aquatic toxicology 96(1): 77-83.
- Nahrgang, J., M. Jonsson og L. Camus (2010c). "EROD activity in liver and gills of polar cod (*Boreogadus saida*) exposed to waterborne and dietary crude oil." Marine environmental research 70(1): 120-123.
- Neff, J.M., (2002): Polycyclic aromatic hydrocarbons in the ocean. In: Neff, J.M. (Ed.), Bioaccumulation in Marine Organisms. Elsevier, Amsterdam: 241–318.
- Neff, J.M., Stubblefield, W.A., (1995): Chemical and toxicological evaluation of water quality following the Exxon Valdez oil spill. Wells, P.G., Butler, J.N., Hughes, J.S. (Eds.), Exxon Valdez Oil Spill: Fates and Effects in Alaskan Waters, ASTM Special Technical Publication #1219. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA: 141–177.
- Nelson, D. R., L. Koymans, T. Kamataki, J. J. Stegeman, R. Feyereisen, D. J. Waxman, M. R. Waterman, O. Gotoh, M. J. Coon, R. W. Estabrook, I. C. Gunsalus og D. W. Nebert (1996). "P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature." Pharmacogenetics 6(1): 1-42.
- Nigro, M., G. Frenzilli, V. Scarcelli, S. Gorbi og F. Regoli (2002). "Induction of DNA strand breakage and apoptosis in the eel *Anguilla anguilla*." Marine environmental research 54(3-5): 517-520.
- Nordvik, A. B. (1995). "The technology windows-of-opportunity for marine oil spill response as related to oil weathering and operations." Spill Science & Technology Bulletin 2(1): 17-46.
- NRC (1987): Committee on Biological Markers of the National Research Council. Biological markers in environmental health research. Environmental Health Perspectives 74: 3-9.
- Payne, J. F. og L. L. Fancey (1982). "Effect of long term exposure to petroleum on mixed function oxygenases in fish: Further support for use of the enzyme system in biological monitoring." Chemosphere 11(2): 207-213.
- Parkinson A. (2001): Biotransformation of xenobiotics,; Klaassen CD, editor. Casarett and Doull's toxicology. New York: McGraw-Hill, 2001: 133-224.
- Pesonen, M., A. Goksoyr og T. Andersson (1992). "Expression of P4501A1 in primary culture of rainbow-trout hepatocytes exposed to beta-naphtoflavone or 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-para-dioxin." Archives of Biochemistry and Biophysics 292(1): 228-233.
- Peterson, C. H., S. D. Rice, J. W. Short, D. Esler, J. L. Bodkin, B. E. Ballachey og D. B. Irons (2003). "Long-term ecosystem response to the Exxon Valdez oil spill." Science 302(5653): 2082-2086.
- Pietrapiana, D., M. Modena, P. Guidetti, C. Falugi og M. Vacchi (2002). "Evaluating the genotoxic damage and hepatic tissue alterations in demersal fish species: a case study in the Ligurian Sea (NW-Mediterranean)." Marine pollution bulletin 44(3): 238-243.
- Pörtner, H. O., M. Lucassen og D. Storch (2005). Metabolic Biochemistry: Its Role in Thermal Tolerance and in the Capacities of Physiological and Ecological Function. Fish Physiology. P. F. Anthony og F. S. John, Academic Press. Volume 22: 79-154.
- Ramachandran, S. D., M. J. Swezey, P. V. Hodson, M. Boudreau, S. C. Courtenay, K. Lee, T. King og J. A. Dixon (2006). "Influence of salinity and fish species on PAH uptake from dispersed crude oil." Marine pollution bulletin 52(10): 1182-1189.
- Reynaud, S. og P. Deschaux (2006). "The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: A review." Aquatic toxicology 77(2): 229-238.
- Risso-de Faverney, C., G. de Sousa, M. Lafaurie og R. Rahmani (1999). "Expression and induction of CYP1A1 in black seabream (*Spondyliosoma cantharus*) hepatocyte cultures: Effects of heavy metals." Polycyclic Aromatic Compounds 13(3): 285-299.

- Roberts, B. J. (1997). "Evidence of proteasome-mediated cytochrome P-450 degradation." Journal of Biological Chemistry 272(15): 9771-9778.
- Ross, K., N. Cooper, J. R. Bidwell og J. Elder (2002). "Genetic diversity and metal tolerance of two marine species: a comparison between populations from contaminated and reference sites." Marine pollution bulletin 44(7): 671-679.
- Roy, N. K., B. Konkle og I. Wirgin (1996). "Characterization of CYP1A1 gene regulatory elements in cancer-prone Atlantic tomcod." Pharmacogenetics 6(3): 273-277.
- Sarkar, A., D. Ray, A. N. Shrivastava og S. Sarker (2006). "Molecular Biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring." Ecotoxicology 15(4): 333-340.
- Schlenk, D., R. Handy, S. Steinert, M. H. Depledge og W. Benson (2008). "Biomarkers." Toxicology of Fishes: 683-731.
- Short, J. W. og P. M. Harris (1996). Petroleum hydrocarbons in caged mussels deployed in Prince William Sound after the Exxon Valdez oil spill. Proceedings of the Exxon Valdez Oil Spill Symposium. S. D. Rice, R. B. Spies, D. A. Wolfe og B. A. Wright. 18: 29-39.
- Siegel, S. (1957). "Nonparametric Statistics." The American Statistician 11(3): 13-19.
- SINTEF (2010): Chemical and toxicological characterization of water accommodated fraction (WAF) of crude oils; Materials and Chemistry box 4760 Sluppen, NO-7465 Trondheim, Norway:
http://www.sintef.no/upload/Materialer_kjemi/Marin%20miljøteknologi/faktaark/WAF-web.pdf
- Smith, E. L., Rowland, S.J., (2005): Potential Ecological Effects of Chemically Dispersed and Biodegraded Oils. Final report. REF: RP 480
- Stagg, R. M. og A. McIntosh (1996). "Hydrocarbon concentrations in the northern North Sea and effects on fish larvae." Science of the Total Environment 186(3): 189-201.
- Stagg, R. M., A. McIntosh og P. Mackie (1995). "Elevation of hepatic monooxygenase activity in Dab (Limanda limanda) in relation to environmental contamination with petroleum-hydrocarbons in the northern North-sea." Aquatic toxicology 33(3-4): 245-264.
- Stagg, R. M., J. Rusin, M. E. McPhail, A. D. McIntosh, C. F. Moffat og J. A. Craft (2000). "Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on expression of CYP1A in salmon (Salmo salar) following experimental exposure and after the Braer oil spill." Environmental Toxicology and Chemistry 19(11): 2797-2805.
- Stegeman, J. J. og P. J. Kloeppersams (1987). "Cytochrome-P-450 isozymes and monooxygenase activity in aquatic animals." Environmental Health Perspectives 71: 87-95.
- Stegeman, J. J. og J. J. Lech (1991). "Cytochrome-P-450 monooxygenase systems in aquatic species - carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure." Environmental Health Perspectives 90: 101-109.
- Stegeman, J.J. and M.E. Hahn (1993): "Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: Current directions in forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species." Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives, Malins, D.C. and Ostrander, G.K., Editors, CRC/Lewis: 87-206.
- Stegeman, J.J., Woodin, B.R., Goksoyr, A., (1988): "Apparent cytochrome P-450 induction as an indication of exposure to environmental chemicals in the flounder *Platichthys flesus*." Marine Ecology-Progress Series 46: 55-60.
- Sturve, J., L. Hasselberg, H. Falth, M. Celander og L. Forlin (2006). "Effects of North Sea oil and alkylphenols on biomarker responses in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*)." Aquatic toxicology 78 Suppl 1: S73-78.
- Thorsen, W. A., W. G. Cope og D. Shea (2004). "Bioavailability of PAHs: Effects of Soot Carbon and PAH Source." Environmental Science & Technology 38(7): 2029-2037.
- Tom, M. og M. Auslander (2005). "Transcript and protein environmental biomarkers in fish--a review." Chemosphere 59(2): 155-162.
- Tom, M., M. Shmul, E. Shefer, N. Chen, H. Slor, B. Rinkevich og B. Herut (2003). "Quantitative evaluation of hepatic cytochrome P4501A transcript, protein and catalytic activity in the striped sea bream (*Lithognathus mormyrus*)." Environmental Toxicology and Chemistry 22(9): 2088-2092.
- Udroiu, I. (2006). "The micronucleus test in piscine erythrocytes." Aquatic toxicology 79(2): 201-204.

- Utvik, T. I. R. og S. Johnsen (1999). "Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in the North Sea." Environmental Science & Technology 33(12): 1963-1969.
- van der Oost, R., J. Beyer og N. P. E. Vermeulen (2003). "Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review." Environmental Toxicology and Pharmacology 13(2): 57-149.
- Viarengo, A., E. Bettella, R. Fabbri, B. Burlando og M. Lafaurie (1997). "Heavy metal inhibition of EROD activity in liver microsomes from the bass *Dicentrarchus labrax* exposed to organic xenobiotics: Role of GSH in the reduction of heavy metal effects." Marine environmental research 44(1): 1-11.
- Viau, C., M. Bouchard, G. Carrier, R. Brunet og K. Krishnan (1999). "The toxicokinetics of pyrene and its metabolites in rats." Toxicology Letters 108(2-3): 201-207.
- Wells, P. G., M. H. Depledge, J. N. Butler, J. J. Manock og A. H. Knap (2001). "Rapid toxicity assessment and biomonitoring of marine contaminants - Exploiting the potential of rapid biomarker assays and microscale toxicity tests." Marine pollution bulletin 42(10): 799-804.
- Whyte, J. J., R. E. Jung, C. J. Schmitt og D. E. Tillitt (2000). "Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure." Critical Reviews in Toxicology 30(4): 347-570.
- Willett, K. L., D. Wassenberg, L. Lienesch, W. Reichert og R. T. Di Giulio (2001). "In Vivo and in Vitro Inhibition of CYP1A-Dependent Activity in *Fundulus heteroclitus* by the Polynuclear Aromatic Hydrocarbon Fluoranthene." Toxicology and Applied Pharmacology 177(3): 264-271.
- Wirgin, I., B. Konkle, M. Pedersen, C. Grunwald, J. Williams og S. C. Courtenay (1996). "A comparison of cytochrome P4501A (CYP1A) mRNA inducibility in four species of Atlantic coast anadromous fishes." Estuaries 19(4): 913-922.
- Zar, J. H. (2010): Biostatistical analysis. Upper Saddle River, N.J., Prentice-Hall/Pearson.
- Zoll-Moreux, C. og V. Ferrier (1999). "The Jaylet test (newt micronucleus test) and the micronucleus test in xenopus: two in vivo tests on amphibia evaluation of the genotoxicity of five environmental pollutants and of five effluents." Water Research 33(10): 2301-2314.